

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DU CATABOLISME HÉPATIQUE DE L'ACIDE
RÉTINOÏQUE CHEZ LE OUAOUARON (*RANA CATESBEIANA*):
EFFETS DE CONTAMINANTS AGRICOLES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR:
JANIK THIBODEAU

JUILLET 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT- PROPOS

Je présente ici mon projet de maîtrise qui a vu le jour en septembre 2007 grâce aux premiers résultats obtenus dans le cadre du « Projet Amphibien ». Ce projet, mis sur pied en 2003 par un groupe de chercheurs du Toxen (UQAM), vise à évaluer le potentiel toxique des contaminants agricoles lessivés dans les rivières avoisinantes, en utilisant le ouaouaron de la rivière Yamaska comme espèce sentinelle. Au fil des ans, les analyses ont permis de constater que les niveaux de vitamine A sanguin et hépatique des individus sont grandement altérés selon l'intensité de l'activité agricole. L'objectif de mon projet était donc de cibler le catabolisme hépatique d'un rétinoïde possiblement tératogène chez les ouaouarons par rapport à un gradient de contamination agricole et d'explorer un métabolisme similaire chez une lignée cellulaire (P19).

Ce mémoire est constitué en trois chapitres, dont le premier est consacré à la revue de littérature des mécanismes impliqués dans le métabolisme de l'acide rétinoïque ainsi que l'utilisation des rétinoïdes comme biomarqueurs. Les deux autres chapitres présentent les résultats obtenus dans le cadre de mes analyses en laboratoire. Le chapitre II est rédigé sous la forme d'un article scientifique dont je suis l'auteure principale, présentement en processus de traduction et qui sera bientôt soumis à la revue «Toxicology in vitro». J'ai pris part à l'échantillonnage sur le terrain en 2007 et en 2008, au niveau de la capture des grenouilles, de leur manipulation ainsi que du prélèvement de tissus pour analyses. J'ai aussi travaillé à la mise au point d'une méthode HPLC pour doser les métabolites de l'acide rétinoïque. J'ai finalement effectué l'ensemble des expérimentations en laboratoire et les analyses statistiques. Monique Boily, ma directrice de recherche, est co-auteure pour cet article.

Le troisième chapitre fait état d'expérimentations ne faisant pas partie de la publication, mais qui présentent un intérêt en ce qui a trait à la culture cellulaire et à l'étude des processus moléculaires entourant le métabolisme de l'acide rétinoïque.

Dans le cadre d'un stage précédant le début de ma maîtrise, j'ai aussi pris part à la publication d'un article scientifique, présenté en annexe, pour lequel je suis co-auteure.

La réalisation de mon projet a été encouragée par des bourses d'étude (2008-2010) provenant d'une subvention 'À la découverte' du CRSNG, octroyée à ma directrice de recherche, ainsi que par une bourse d'excellence de l'UQAM (2009), Fonds à l'accessibilité et à la réussite des études - FARE).

Je tiens à remercier Monique Boily, ma directrice de recherche pour son expertise, sa générosité et surtout sa patience. Je tiens aussi à remercier ma codirectrice Joanne Paquin pour ses conseils, ses idées et ses réflexions. Ce projet de maîtrise n'aurait pas pu être ce qu'il est sans le support et la bonne humeur de Philip Spear. Je dois décerner un merci tout spécial à Marjolaine Bisson qui m'a épaulée durant la mise au point et l'optimisation des protocoles. Je souhaite également souligner la générosité de Frédéric Bouchard et de Philippe Ducharme pour leurs nombreux conseils dans les méthodes de culture cellulaire. Finalement, je tiens à remercier ma famille et mon entourage immédiat, mais tout particulièrement mon collègue Sébastien Filion, pour son écoute en temps de lassitude et surtout pour la belle amitié qui nous lie.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT PROPOS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	6
1.1 Amphibien à l'étude: le ouaouaron	6
1.2 La vitamine A et les rétinoïdes	7
1.2.1 Structures et propriétés des rétinoïdes	7
1.2.2 Importance physiologique de la vitamine A	8
1.2.3 Métabolisme des rétinoïdes	9
1.2.3.1 Absorption et entreposage du ROH	9
1.2.3.2 Métabolisme cellulaire de l'AR	12
1.2.3.3 Action de l'AR sur la transcription génique	14
1.2.3.4 Inactivation de l'AR en produits solubles	15
1.2.4 Interactions moléculaires dans le catabolisme de l'AR	17
1.2.4.1 Stimulation du catabolisme	17
1.2.4.1.1 Le TTNPB, un analogue du <i>tt</i> -AR	17
1.2.4.1.2 L'acide méthoprène, un analogue de l'acide 9- <i>cis</i> -rétinoïque	18
1.2.4.1.3 Les pesticides organochlorés	18
1.2.4.2 Inhibition du catabolisme	19
1.2.4.2.1 Les fongicides « azolés »	19

1.3	Mise au point d'un biomarqueur d'exposition	19
1.4	Exploration du métabolisme de l'AR sur un modèle cellulaire	21
1.4.1	Mise en contexte	21
1.4.2	Généralités	21
1.4.3	Catabolisme de l'AR	22
1.5	Objectifs et hypothèses	23
CHAPITRE II		
ÉTUDE DU CATABOLISME HÉPATIQUE DE L'ACIDE RÉTINOÏQUE CHEZ LE OUAOUARON (<i>RANA CATESBEIANA</i>): EFFETS DE CONTAMINANTS AGRICOLES		25
2.1	Résumé	26
2.2	Introduction	27
2.3	Matériel et méthodes	30
2.3.1	Produits chimiques	30
2.3.2	Sites d'échantillonnage	30
2.3.3	Capture des animaux	31
2.3.4	Extraction des microsomes	31
2.3.5	Caractérisation partielle de l'activité enzymatique	31
2.3.6	Essais enzymatiques et dosage des produits de la réaction	32
2.3.7	Essais des inhibiteurs	34
2.3.8	Analyses statistiques	34
2.4	Résultats	35
2.4.1	Caractérisation partielle de l'activité enzymatique	35
2.4.2	Activité enzymatique chez le ouaouaron de la rivière Yamaska	36
2.5	Discussion	39
2.6	Remerciements	45
2.7	Références	46

CHAPITRE III	
EXPLORATION DU CATABOLISME DE L'AR SUR UN MODÈLE CELLULAIRE	57
3.1 Mise en contexte	57
3.2 Matériel et méthode	58
3.2.1 Culture cellulaire	58
3.2.2 Prétraitement avec <i>tt</i> -AR	59
3.2.3 Microsomes cellulaires	59
3.2.4 Essais enzymatiques et extraction des métabolites	60
3.2.5 Dosage des rétinoïdes	60
3.3 Conclusions relatives aux expérimentations	61
CONCLUSION	65
ANNEXES	68
RÉFÉRENCES	84

LISTE DES FIGURES

1.1.	Structure moléculaire de divers rétinoïdes	8
1.2.	Absorption de la vitamine A au niveau de l'intestin	11
1.3.	Entreposage hépatique des rétinoïdes	12
1.4.	Métabolisme intracellulaire de l'AR	14
1.5.	Activité nucléaire de l'AR	15
2.1.	Mesure de l'activité d'oxydation de l'AR dans les microsomes hépatiques de ouaouarons échantillonnés dans la rivière Yamaska	52
2.2.	Catabolisme de l'AR testé à partir de microsomes hépatiques des ouaouarons mâles et femelles, échantillonnés dans le bassin de la rivière Yamaska en 2007 et 2008; comparaison entre sexes	53
2.3.	Catabolisme de l'AR testé à partir de microsomes hépatiques des ouaouarons mâles et femelles, échantillonnés dans le bassin de la rivière Yamaska en 2007 et 2008; comparaison entre sites	54
2.4.	Protéines mesurées dans les microsomes hépatiques des ouaouarons échantillonnés dans le bassin de la rivière Yamaska en 2007 et 2008	55
2.5.	Poids du foie des ouaouarons mâles et femelles échantillonnés dans le bassin de la rivière Yamaska en 2007 et 2008	56
A-1	Exemple de chromatogramme	69

LISTE DES TABLEAUX

2.I. Longueur museau-cloaque (cm) mesurée sur les ouaouarons échantillonnés dans le bassin de la rivière Yamaska en 2007 et 2008	51
A-I. Pesticides dosés dans les différents sites d'échantillonnage en 2007 et en 2008	70
A-II. Nutriments dosés dans les différents sites d'échantillonnage en 2007	73
A-III. Nutriments dosés dans les différents sites d'échantillonnage en 2008	74
A-IV. Effectifs de capture pour 2007 et 2008	75

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

4-OH-AR	Acide 4-hydroxy rétinol
<i>tt</i> -4-oxo-AR	Acide <i>tout-trans</i> -4-oxo rétinol
<i>tt</i> -AR	Acide <i>tout-trans</i> rétinol
13- <i>cis</i> -4-oxo-AR	Acide 13- <i>cis</i> -4-oxo rétinol
9- <i>cis</i> -AR	Acide 9- <i>cis</i> rétinol
13- <i>cis</i> -AR	Acide 13- <i>cis</i> rétinol
ADH	Aldéhyde déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AR	Acide rétinol
ARAT	Acyl CoA-rétinol acyltransférase
BHT	Hydroxytoluène butylé
ARN _m	Acide ribonucléique messager
CRABP	Protéine de transport cellulaire de l'acide rétinol
CRBP	Protéine de transport cellulaire du rétinol
CYP450	Gènes codant pour les enzymes du cytochrome P-450
ER	Esters de rétinol
HER	Hydrolase des esters de rétinol
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
LRAT	Lécithine: rétinol acyltransférase
MCP19	Milieu complet de culture pour P19
NAD(H)	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP(H)	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PR	Palmitate de rétinol
RALDH	Rétinaldéhyde déshydrogénase
RAR	Récepteur de l'acide rétinol
RARE	Élément de réponse à l'acide rétinol
RBP	Protéine de transport du rétinol
RDH	Rétinol déshydrogénase
ROH	Rétinol
RXR	Récepteurs X des rétinoïdes
TTNPB	Acide(E)-4-[2-(5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-naphthylenyl)-1-propenyl] benzoïque
UDPGA	Acide 5'-diphospho-glucuronique uridine
UV	Ultra-Violet

RÉSUMÉ.

Au courant du demi-siècle dernier, le déclin des espèces et des populations d'amphibiens est devenu un problème bien réel. Aujourd'hui, la science propose de nombreux facteurs tant environnementaux qu'anthropiques pour expliquer ce phénomène. Parmi ceux-ci, la contamination des milieux aquatiques par les pesticides et fertilisants agricoles semble corrélér tout particulièrement. D'ailleurs, plusieurs cas de malformations aux membres ont été répertoriés chez des grenouilles vivant en zones agricoles. Ce phénomène pourrait compromettre, entre autres, le succès reproductif des populations et par conséquent la survie des espèces dans le milieu. Le type d'anomalie rapporté rappelle fortement celui provoqué lors d'un déséquilibre dans l'homéostasie de l'acide rétinoïque (AR).

Les rétinoïdes sont des molécules endogènes responsables d'un grand nombre de processus physiologiques d'importance, et parmi ces molécules, l'AR joue un rôle crucial au moment de la morphogenèse. Ses effets sont assurés par sa liaison à des récepteurs nucléaires spécifiques. La synthèse et le catabolisme de l'AR sont finement régulés étant donné la forte activité nucléaire de la molécule. Un léger déséquilibre dans le métabolisme de l'AR peut donner lieu à de graves conséquences sur le développement embryonnaire d'un organisme. Certains pesticides sont connus pour interférer dans le métabolisme et les voies de signalisation de l'AR.

L'hypothèse de départ du projet postule que le mélange de pesticides et de fertilisants auquel les amphibiens sont exposés dans les plans d'eau avoisinant les terres agricoles provoque une perturbation du métabolisme des rétinoïdes en altérant le travail d'enzymes-clefs. C'est ainsi que des concentrations anormales d'AR seraient à la base des effets tératogènes observés sur le terrain.

Pour vérifier cette hypothèse, des essais enzymatiques ont été effectués pour juger l'efficacité enzymatique des cytochromes *P450* à cataboliser l'AR en un métabolite secondaire majeur, l'acide *tout-trans-4-oxo-rétinoïque* (*tt-4-oxo-AR*), sur des animaux provenant d'habitats contaminés selon un gradient d'activité agricole. Le choix du modèle amphibien s'est arrêté sur le ouaouaron (*Rana catesbeiana*). En effet, la présente étude s'inscrit dans le « Projet Amphibien », une grande étude toxicologique portant sur la santé du ouaouaron vivant en milieu agricole, dans le bassin versant de la rivière Yamaska, au Québec. La caractérisation partielle de l'activité catabolique des microsomes hépatiques de ouaouaron sur l'AR a permis, pour la première fois, la mise en évidence d'un substrat préférentiel, la détermination de valeurs de K_m et V_{max} et la démonstration de l'implication des enzymes du *CYP450* dans cette réaction.

De façon générale, l'activité d'oxydation chez les mâles était plus importante que chez les femelles, malgré un poids du foie et des concentrations en protéines microsomales plus faibles et ce, pour les deux années d'échantillonnage. Les résultats suggèrent aussi une stimulation du catabolisme hépatique de l'AR par les microsomes hépatiques des ouaouarons provenant des sites les plus contaminés. Aussi, ayant une taille significativement plus faible, les grenouilles des sites fortement contaminés semblaient connaître certains problèmes de croissance. L'étude comparative de l'efficacité d'oxydation de l'AR chez le ouaouaron de la rivière Yamaska aura donc permis de cerner davantage l'un des mécanismes impliqués dans la tératogénie associée à un déséquilibre dans les concentrations effectives d'AR.

Dans la seconde partie du projet, le catabolisme de l'AR a été tenté sur un modèle cellulaire choisi, les cellules P19. Cette exploration avait pour objectif de reproduire et maximiser un protocole d'oxydation de l'AR sur des cellules répondant à cette molécule, de façon à l'utiliser ultérieurement pour étudier les bases moléculaires derrière le métabolisme de l'AR. La culture des cellules P19, l'extraction de microsomes à partir de ces cellules et l'activité catabolique de l'AR en essais enzymatiques ont été investigués selon un protocole déjà établi. Les premières expériences n'ayant pas fonctionné, un prétraitement des cultures à l'AR a été expérimenté. Le taux de mortalité dans les cultures suite à cette pré-exposition s'est vu augmenter. De plus, bien que quantifiable, les concentrations de produits formés (*tt*-4-oxo-AR) étaient très faibles et les résultats rarement reproductibles. Suite à ces constatations, une mise au point de la méthode d'extraction des microsomes dans le but d'augmenter le rendement des protéines microsomales à partir des cellules a été suggérée pour de futures tentatives. Aussi, des essais sur les homogénats cellulaires seraient à prévoir pour tenter de maximiser la réponse enzymatique. Malgré tout, l'utilisation des cellules P19 pour l'étude des mécanismes sous-jacents à l'émergence des malformations associées à l'AR observées chez les amphibiens en milieu agricole s'avère une avenue prometteuse.

Mots clefs: Acide rétinoïque, CYP450, acide 4-oxo-rétinoïque, microsomes hépatiques, *Rana catesbeiana*, contaminants agricoles, cellules P19.

INTRODUCTION.

Depuis la fin des années 70, on constate une grave diminution dans l'abondance des espèces et des populations d'amphibiens, un phénomène à l'échelle planétaire (Beebee et Griffiths, 2005; McCallum, 2007; Nyström *et al.*, 2007; Stuart *et al.*, 2004). La rapidité avec laquelle certaines populations se sont effondrées, l'étendue de ces vagues de disparition et leur synchronisme dans plusieurs régions du globe ont obligé les scientifiques à s'interroger sur l'origine de ce grave déclin. Les études se succèdent et les chercheurs s'entendent pour dire que ce phénomène est multifactoriel: changements climatiques (McMenamin *et al.*, 2008; Pounds *et al.*, 2007), disponibilité et qualité des habitats (Becker *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2001) et maladies infectieuses diverses (Daszak, *et al.*, 2003; Raffel *et al.*, 2008). Toutefois, la contamination environnementale par les pesticides d'origine agricole semble corrélér tout particulièrement (Albert *et al.*, 2007; Davidson, *et al.*, 2001; Loveridge *et al.*, 2007; Relyea, 2005, 2009; Relyea et Diecks, 2008; Sparling *et al.*, 2001).

Au Québec, comme presque partout ailleurs, le secteur agroalimentaire occupe une grande part de l'économie de marché. Entre les années 1990 et 2008 la valeur des terres agricoles transigées au Québec a été multipliée par plus de 4, passant de 1620 \$/ha à 7 081 \$/ha (Valeur des terres agricoles dans les régions du Québec, 2005 et 2009)¹. Alors que le territoire labouré diminuait considérablement, les superficies consacrées aux grandes cultures (maïs et soja) ont augmenté au détriment d'autres utilisations des terres agricoles, couvrant 26,4% du territoire cultivé au Québec.

¹ <http://www.fadq.qc.ca/>

Près de 56 % des superficies en maïs se trouvent dans la région de la Montérégie, principalement dans les bassins versants des rivières Yamaska et Richelieu (Simard, 2002; 2004)². Bien que lucrative, la culture du maïs nécessite d'énormes quantités de fertilisants et pesticides. En 2006, plus de 3,5 millions de kg d'ingrédients actifs ont été vendus au Québec, dont plus de la moitié exclusivement pour les monocultures (Gorse et Dion, 2009). Les pratiques agricoles rendant les sols vulnérables à l'érosion, les pesticides et les engrais ruissellent facilement dans les cours d'eau avoisinants, rendant précaire la qualité des milieux aquatiques (Simard, 2004)². Les fertilisants azotés, l'atrazine et le glyphosate sont parmi les contaminants agricoles les plus abondants dans les cours d'eau avoisinant les zones de culture intensive (Giroux *et al.*, 2006).

Depuis déjà quelques années, des effets néfastes sur la santé de la faune aquatique vivant en zone agricole sont répertoriés. Plusieurs études ont été menées sur la toxicité chez les poissons, mais l'intérêt est d'autant plus grand concernant les amphibiens. En effet, leur cycle de vie majoritairement aquatique, la grande perméabilité de leur peau ainsi que leur position dans la chaîne alimentaire favorisent la bioaccumulation et donc l'exposition continue aux contaminants environnementaux (Loveridge *et al.*, 2007). Parmi les effets toxiques des pesticides démontrés chez différentes espèces de grenouilles, se dénombrent, entre autres, l'augmentation du taux de mortalité (Relyea, 2005, 2009; Relyea et Diecks, 2008), la diminution de l'activité cholinergique (Sparling *et al.*, 2001), de l'immunité innée (Davidson *et al.*, 2001) et du compte phagocytaire (Brodkin *et al.*, 2007), la réduction du développement des gonades chez le têtards (Hayes *et al.*, 2003) ainsi que la perturbation de l'homéostasie de la vitamine A (Bérubé *et al.*, 2005).

² <http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/bassinversant/global-2004/index.htm>

Parallèlement à ces effets physiologiques, plusieurs cas de malformations ont été observés chez des grenouilles vivant à proximité de zones agricoles. L'événement le plus important est sans doute celui du 8 août 1995 au Minnesota où des élèves d'une école élémentaire ont retrouvé plusieurs grenouilles malformées lors d'une sortie scolaire (Vandenlangenberg *et al.*, 2003). Au Québec, des grenouilles difformes ont été observées dans les eaux contaminées de la vallée du St-Laurent (Ouellet *et al.*, 1997). Les types d'anomalies les plus fréquemment rencontrés comprennent une réduction ou une absence d'un segment de membre (ectromélie, phocomélie), l'absence d'un ou plusieurs membres (amélie) ou, à l'opposé, des parties de membre ou des membres en surnombre (polymélie, polyphalangie, polydactylie) et finalement des membres complets mais anormalement développés (Meteyer *et al.*, 2000). Les conséquences de telles anomalies pour un organisme sont fatales: mobilité réduite avec répercussions sur la quête de la nourriture, susceptibilité à la prédation et diminution du succès reproductif.

Les recherches concernant les causes des effets tératogènes en milieu agricole ont évidemment pris de l'ampleur au cours des dernières décennies. De nombreuses études ont ainsi permis de montrer que l'apparition d'effets tératogènes serait due, entre autres, à une perturbation du métabolisme des rétinoïdes. Les rétinoïdes sont des micronutriments dérivés de la Vitamine A (rétinol: ROH) essentiels à un grand nombre de processus physiologiques de première importance. Parmi ces molécules, l'AR joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire. Lors de l'organogenèse, par exemple, l'AR fixe des récepteurs nucléaires spécifiques et, agissant comme facteur de transcription, influence le patron spatial de la formation des membres. Les concentrations d'AR sont finement régulées étant donné la forte activité nucléaire de celui-ci et un léger débalancement peut conduire à de graves effets tératogènes (Hoffmann et Eichele, 1994; Morriss-Kay et Sokolova, 1996).

C'est en partie grâce à l'action d'enzymes de la famille des cytochromes *P450* (*CYP450*) que les concentrations d'AR actives sont contrôlées. Suite à son action au niveau de l'ADN, l'AR est catabolisé en produits solubles par les *P450* qui peuvent ensuite être facilement éliminés. Certaines substances dont le TTNPB, l'acide méthoprène et certains pesticides organochlorés sont reconnus pour interférer dans le métabolisme des rétinoïdes. Ainsi peut-on croire que des contaminants puissent nuire au travail de ces enzymes-clefs, changeant les concentrations cellulaires d'AR et favorisant le développement anormal d'un organisme exposé. Le système des rétinoïdes est donc un biomarqueur adéquat pour identifier des substances comme étant potentiellement toxiques ou tératogènes et pour mieux saisir les mécanismes cellulaires impliqués.

Le projet Amphibien mis de l'avant en 2003 par des chercheurs du TOXEN de l'UQÀM vise à étudier les effets des contaminants d'origine agricole sur les populations de ouaouarons vivant dans le bassin versant de la rivière Yamaska. Cette rivière est l'affluent le plus pollué du fleuve St-Laurent et constitue donc un site de choix pour évaluer les effets de la pollution des milieux aquatiques sur l'homéostasie des rétinoïdes. La situation du ouaouaron n'est pas précaire au Québec et c'est pourquoi il a été sélectionné comme espèce sentinelle. Les premières études ont permis de constater une diminution significative dans les réserves de rétinoïdes hépatiques ainsi que dans les concentrations plasmatiques en ROH chez les individus provenant des sites fortement contaminés (Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005). L'objectif premier du présent projet de maîtrise était de comparer le profil catabolique de l'AR chez des ouaouarons provenant de sites exposés à un gradient de contamination agricole (faible, moyenne, forte). Pour juger de l'efficacité de l'activité des *CYP450*, un protocole d'essai enzymatique a préalablement été mis au point pour le modèle choisi.

Une fois les paramètres de base établis, les essais ont pu être effectués sur l'ensemble des individus et les résultats comparés entre les sexes et les sites d'échantillonnage. Cette étude aura donc permis de vérifier certaines hypothèses en ce qui a trait au système des rétinoïdes chez la grenouille.

Ce projet de grande envergure permet de juger de l'effet de la contamination des milieux aquatiques sur le système des rétinoïdes. Toutefois, les mécanismes cellulaires sous-jacents aux malformations des membres, restent à peu près inconnus. C'est dans cette optique qu'une seconde partie du projet visait à explorer le métabolisme de l'AR à partir d'un modèle cellulaire répondant à la signalisation des rétinoïdes, pour éventuellement procéder à des expositions en laboratoire et ainsi cibler les étapes critiques potentiellement altérées par des contaminants. Comme il n'existe pas de lignée cellulaire *in vitro* dérivée des amphibiens, la lignée cellulaire P19 issue d'un carcinome embryonnaire de souris a été sélectionnée. Ce modèle apparaît tout à fait adéquat puisque les cellules expriment de façon naturelle et stable les enzymes et récepteurs d'intérêt. En réduisant au maximum les biais associés aux études *in vivo*, ce modèle d'étude pourrait fournir plusieurs réponses en ce qui a trait aux mécanismes régissant l'apparition des malformations observées chez des grenouilles vivant en milieux agricoles.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES.

1.1. AMPHIBIEN À L'ÉTUDE: LE OUAOUARON.

Le ouaouaron aussi appelé Grenouille-taureau, est le plus gros spécimen anoure de l'Amérique du Nord. C'est une espèce originaire de la côte Est des États-Unis, de la frontière mexicaine à la région des Grands Lacs et au sud du Canada. Elle a été introduite avec succès dans de nombreuses parties du monde, entre autre l'Europe (Lever, 2003). Au Canada, le ouaouaron se retrouve en Nouvelle-Écosse et dans le sud du Nouveau-Brunswick, du Québec et de l'Ontario. Au Québec, il est particulièrement commun en Outaouais et dans la vallée du Saint-Laurent. Le ouaouaron est une espèce aquatique qui peut habiter la plupart des points d'eau permanents: lacs, baies, rivières, étangs et marais, (Desroches et Rodrigue, 2004).

Rana catesbeiana est une espèce très vorace. Les insectes et autres invertébrés constituent une part importante de sa diète. Il s'alimente fréquemment de grenouilles de plus petite taille, y compris des membres de sa propre espèce, des têtards, des petits poissons et des écrevisses. Exceptionnellement, il peut aussi se nourrir de souris ou de couleuvres.

La reproduction du ouaouaron s'étend sur une grande période, de juin à août. Les mâles sont très territoriaux (territoire défendu: 2,5 à 3m) et les femelles sélectionnent leur partenaire en fonction du chant et de la qualité du territoire qu'il défend. Le mâle fertilise les œufs à mesure qu'ils sont pondus par la femelle ce qui forme une pellicule à la surface de l'eau. L'éclosion des œufs survient 3 à 6 jours après la ponte. Les têtards restent à l'état larvaire pendant 2 à 3 ans avant de se métamorphoser.

Au Québec, l'artificialisation des berges et des lacs et le développement de la villégiature font du tort aux populations locales de ouaouarons. La récolte commerciale pourrait aussi menacer l'espèce. En effet, l'espèce est recherchée pour la valeur gastronomique de ses cuisses. Seulement dans la province, on estime qu'entre 13 000 et 25 000 individus sont capturés chaque année pour la consommation humaine ou pour être vendus aux institutions d'enseignement comme spécimen de laboratoire (Desroches et Rodrigue, 2004).

1.2 LA VITAMINE A ET LES RÉTINOÏDES.

Le système entourant les molécules dérivées de la vitamine A n'est bien connu et documenté que pour la classe des mammifères. Dans la présente recherche, la littérature et le design expérimental relatifs aux rétinoïdes sont donc basés sur les concepts et théories connus pour cette classe animale.

1.2.1 Structure et propriétés des rétinoïdes.

Les rétinoïdes constituent une famille de molécules lipophiles dont la structure s'apparente fortement à celle du ROH, globalement connu sous le nom de vitamine A. Ils consistent en un cycle cyclohexène triméthylé sur une chaîne tétraène dont l'extrémité est attachée à un groupement fonctionnel polaire carbone-oxygène (**Figure 1.1**). Leur nature instable en fait des molécules très sujettes à l'isomérisation et à la dégradation sous l'influence de la lumière. Parmi les isomères possibles, les formes *tout-trans*, *9-cis* et *13-cis* sont les plus courantes. L'oxygène de l'air ainsi que la chaleur provoquent rapidement l'oxydation des rétinoïdes, menant à leur inactivation (Barua et Furr, 1998).

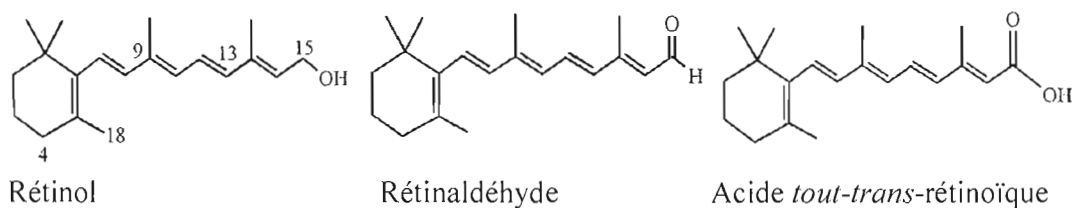


Figure 1.1. Structure moléculaire de divers rétinoïdes. Adapté de Napoli, 1999.

1.2.2 Importance physiologique de la vitamine A.

Dans l'organisme, la vitamine subit plusieurs transformations enzymatiques, chaque étape produisant une nouvelle molécule de la famille des rétinoïdes. Les rétinoïdes endogènes sont retrouvés sous différentes formes. Plusieurs molécules rétinoïques représentent les formes de synthèse (ROH et rétinaldéhyde), d'entreposage (esters de rétinol) et finalement d'élimination (métabolites polaires). L'ensemble des effets propres aux rétinoïdes est toutefois engendré par la liaison d'un rétinoïde « actif », l'AR, à son récepteur nucléaire spécifique (Boily *et al.*, 2004).

La grande famille des rétinoïdes couvre un large spectre d'implications physiologiques. L'un des phénomènes les plus étudiés concernant les rétinoïdes est sans doute l'implication essentielle du rétinaldéhyde dans la régénération des pigments visuels (Rushton et Henry, 1968). Plus récemment, l'AR a été reconnu comme un inducteur de la sécrétion de certaines cytokines inflammatoires (Dzhagalov *et al.*, 2007), provoquant une augmentation de la prolifération et de l'activité des cellules T (Ertesvag *et al.*, 2002). C'est par contre en tant que modulateur de la croissance et du développement embryonnaire que l'AR est le plus sollicité. La molécule active influence des événements aussi fondamentaux que la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la régionalisation cellulaire au moment de l'organogénèse chez l'embryon (Campo-Paysaa *et al.*, 2008; Duester, 2008; Napoli, 1996).

Pour l'ensemble des vertébrés, la segmentation, ou l'arrangement périodique des vertèbres qui formeront la colonne vertébrale, est un événement embryonnaire arbitré par l'AR. Selon le gradient de sa concentration et par l'entremise de récepteurs nucléaires spécifiques, l'AR guide le positionnement des somites à partir du mésoderme. Malgré les grandes différences morphologiques entre les diverses classes de vertébrés, le métabolisme des rétinoïdes et plus particulièrement les molécules qui le rendent possible, ont été très bien conservés durant l'évolution. Par conséquent, l'implication de l'AR dans le phénomène de segmentation chez le poisson (Vermot et Pourquié, 2005), l'amphibien (Moreno *et al.*, 2008; Moreno et Kintner, 2004), l'oiseau (Diez Del Corral *et al.*, 2003; Kawakami *et al.*, 2005) et le mammifère (Vermot *et al.*, 2005) est fortement comparable.

Bien qu'elle soit nécessaire dès la vie embryonnaire, un excès ou une carence en vitamine A peut provoquer de graves conséquences. En situation de carence en ROH, l'ensemble des organes et tissus est sujet à l'hypovitaminose, rendant leur développement précaire. Lors d'un grave manque, l'absence de ROH peut aller jusqu'à provoquer la mort de l'embryon. De plus, un excès ou une carence en AR peut engendrer des malformations, une fragilité osseuse ou encore une inhibition de la croissance (Boily *et al.*, 2004; Mazurais *et al.*, 2009; Zile, 2001).

1.2.3 Métabolisme des rétinoïdes.

1.2.3.1 Absorption et entreposage du ROH

Parce que les vertébrés ne peuvent la synthétiser *de novo*, l'apport en vitamine A se fait exclusivement par le biais de la diète. Les sources possibles de rétinoïdes incluent les aliments d'origine animale, comme le foie et le jaune d'œuf, dans lesquels la vitamine A, sous sa forme estérifiée, est disponible (esters de rétinol: ER). Les fruits et légumes verts et jaunes, quant à eux, contiennent des provitamines comme le β -carotène, précurseur rétinoïque (Tzimas et Nau, 2001). Le β -carotène est absorbé tel quel par les entérocytes à partir de la lumière de l'intestin.

Une fois dans la muqueuse intestinale, il est converti dans un premier temps en rétinaldéhyde par la β -carotène-15,15'-dioxgénase, et par la suite en ROH grâce à la rétinaldéhyde réductase. Lorsqu'absorbée sous forme d'esters, la vitamine A est d'abord transformée en ROH au niveau de la lumière intestinale par des enzymes pancréatiques, avant d'être absorbée par diffusion facilitée par les entérocytes (**Figure 1.2**).

Lorsque l'organisme est en situation de suffisance, le ROH en surplus est estérifié en palmitate de rétinol (PR) par des enzymes hépatiques (LRAT- lécithine: rétinol acyltransférase et ARAT-acyl CoA-rétinol acyltransférase). Le PR résultant est jumelé à des triglycérides et des apoprotéines qui s'agglomèrent sous forme de chylomicrons (**Figure 1.2**). Ces derniers sont drainés par le système lymphatique jusqu'au foie où, par endocytose, le PR est libéré et transféré aux cellules étoilées. C'est à cet endroit que la vitamine A est majoritairement entreposée, sous forme de PR (**Figure 1.3**). Au moment d'une demande ciblée par le foie lui-même ou les tissus non hépatiques, les ER sont hydrolysés (HER: hydrolase des esters de rétinol) et le ROH formé circule dans le sang jusqu'au tissu requérant grâce à une protéine de transport plasmatique (RBP: retinol binding protein) (Boily *et al.*, 2003; Napoli, 1996, 1999; Wolf, 2001).

Lumière intestinale

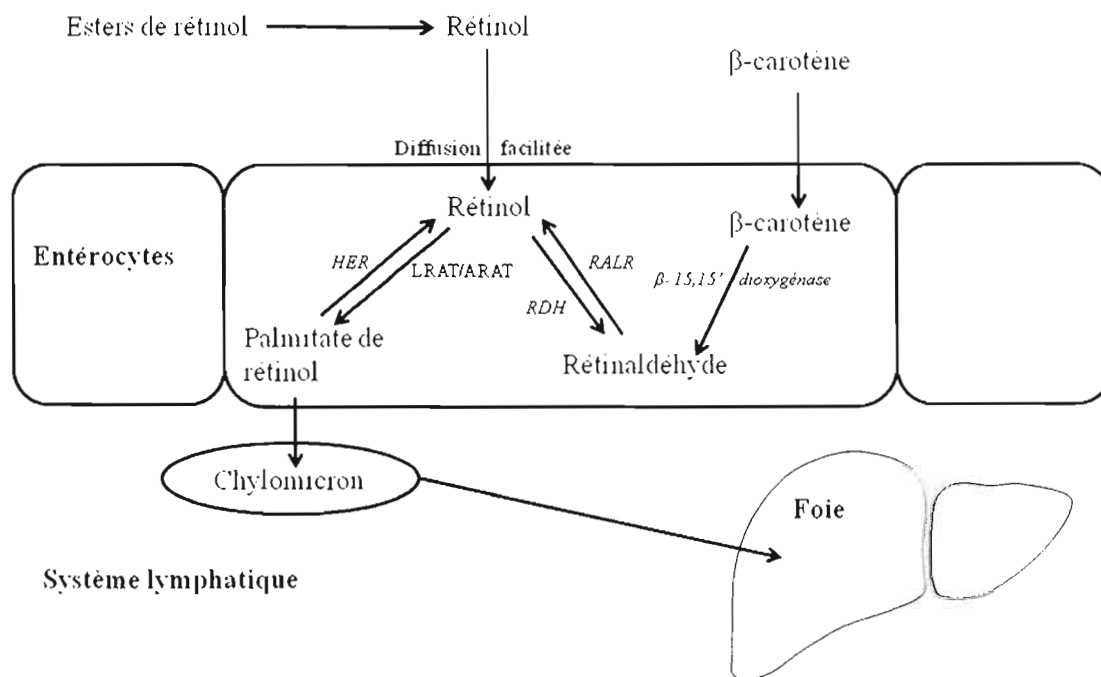


Figure 1.2. Absorption de la vitamine A au niveau de l'intestin. ARAT: Acyl-CoA: rétinol acyltransférase, LRAT: Lécithine: rétinol acyltransférase, HER: Hydrolase des esters de rétinol, RDH: Rétinol déshydrogénase, RALR: Rétinaldéhyde réductase. Inspiré de Napoli (1996, 1999) et Wolf (2001).

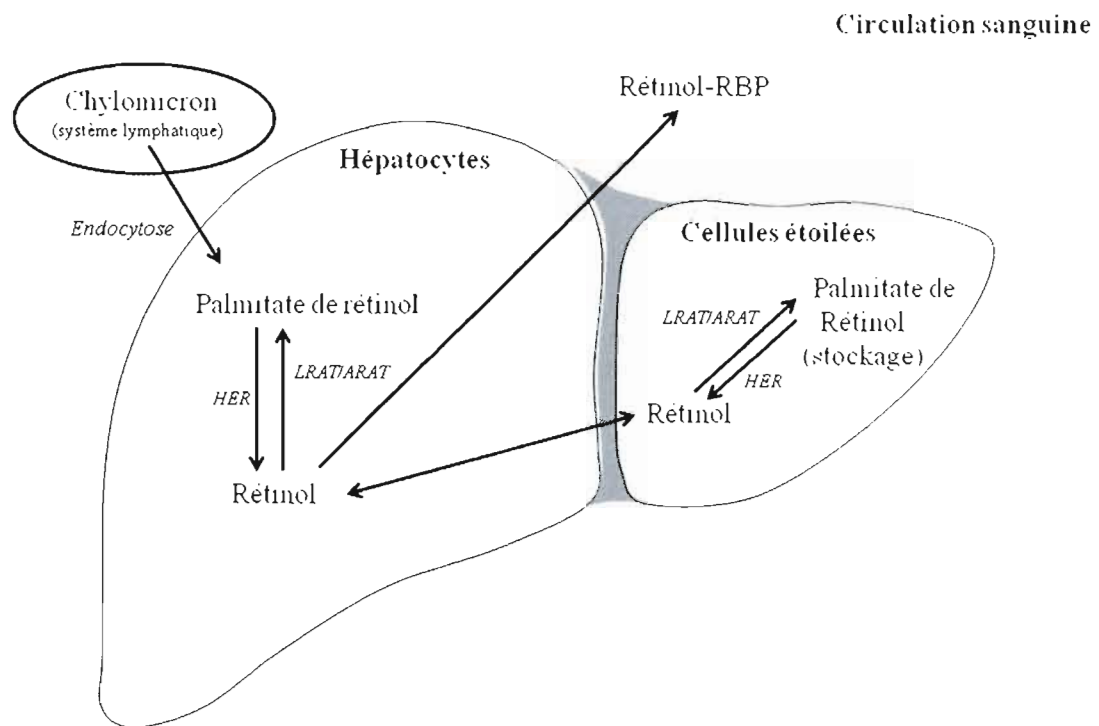


Figure 1.3. Entreposage et libération hépatique des rétinoïdes. RBP: Protéine de transport du rétinol. HER: Hydrolase des esters de rétinol, ARAT: Acyl-CoA: rétinol acyltransférase, LRAT: Lécithine: rétinol acyltransférase. Inspiré de Napoli (1996, 1999) et Wolf (2001).

1.2.3.2 Métabolisme cellulaire de l'AR

Une fois arrivé au tissu en besoin, le complexe ROH-RBP est reconnu et fixé par un récepteur membranaire spécifique (STRAT6), qui diminue l'affinité du ROH envers la RBP et lui permet de s'y dissocier et de pénétrer, seul, à l'intérieur de la cellule (**Figure 1.4**). Une fois intégré à la cellule, le ROH se lie à une nouvelle protéine (CRBP: cellular retinol binding protein) (Duester, 2008). Le complexe formé sert par la suite de substrat à deux types d'enzymes: les alcool- et rétinol-déshydrogénases. L'alcool déshydrogénase (ADH) est une enzyme cytosolique dépendante du NAD(H) tandis que la rétinol déshydrogénase (RDH) se retrouve dans la fraction microsomale et utilise le NADP(H) comme cofacteur.

Le produit de l'oxydation réversible exécutée par ces enzymes, le rétinaldéhyde toujours lié à CRBP, devient à son tour la cible d'une seconde oxydation, cette fois essentiellement irréversible.

Cette étape est catalysée par les différents isomères de la rétinaldéhyde déshydrogénase (RALDH) qui se rencontrent majoritairement dans le cytosol et requièrent le NAD(H) comme cofacteur enzymatique. L'activité des RALDHs sur le complexe rétinaldéhyde-CRBP donne lieu à la formation de l'AR, qui lie à son tour une protéine intracellulaire (CRABP: cellular retinoic acid binding protein). Cette protéine agit à titre de navette, transférant l'AR du cytoplasme vers le noyau et contrôle ainsi les quantités d'AR disponibles pour la liaison aux récepteurs nucléaires. Il existe deux isoformes de CRABP: la CRABP-I, qui conserve AR hors du noyau et la CRABP-II qui guide AR vers le génome pour y activer les récepteurs RAR (Napoli, 1993, 1996; Ottonello *et al.*, 1993; Sessler et Noy, 2005).

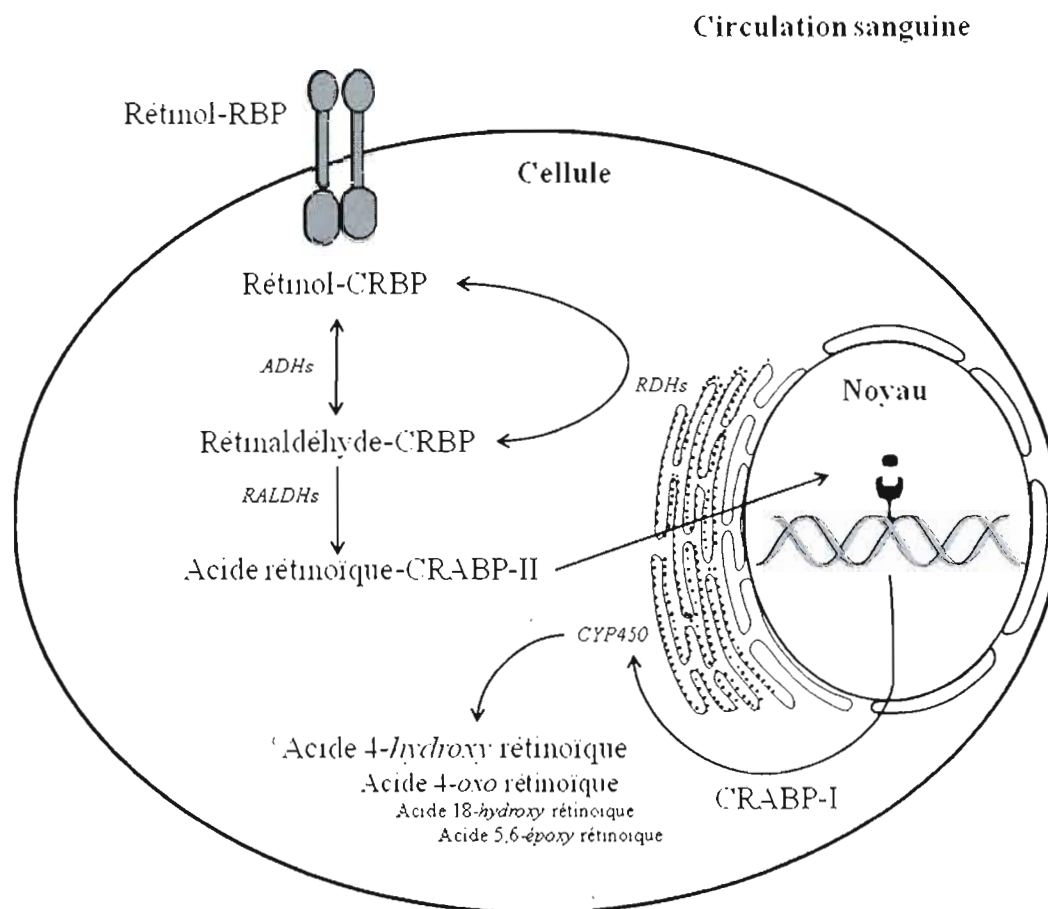


Figure 1.4: Métabolisme intracellulaire de l'AR. ADHs: Alcool déshydrogénases, CRABP: Protéine de transport cellulaire de l'AR, RALDHs: Rétinaldéhyde déshydrogénases, RDHs: Rétinol déshydrogénases, CYP450: Cytochrome *P*450, RBP: Protéine de transport du rétinol. Inspiré de Duester (2008) et Nezzar *et al.*, 2007.

1.2.3.3 Action de l'AR sur la transcription génique.

Les actions biologiques des rétinoïdes dépendent des récepteurs X des rétinoïdes (RXRs) et des récepteurs à l'AR (RARs), qui représentent des facteurs de transcription activés par la liaison du ligand (**Figure 1.5**).

Les deux familles de récepteurs nucléaires sont divisées en trois différents types (α , β et γ), issus du codage de gènes distincts. Chacun d'eux (RAR α,β,γ et RXR α,β,γ) se rencontre sous plusieurs isoformes, résultat d'un épissage alternatif ou de l'utilisation préférentielle de promoteurs. Chaque isoforme est exprimée de façon constitutive et lie l'ADN en l'absence de son ligand. Ils suivent également des patrons précis d'expression, qui dépendent du temps et de l'espace, au cours du développement embryonnaire et de la vie adulte d'un organisme. La régulation transcriptionnelle des gènes cibles des rétinoïdes repose, en plus de la fixation du ligand *tout-trans* à RAR, sur la reconnaissance entre les deux récepteurs et l'assemblage coopératif des hétérodimères RAR-RXR au niveau des régions promotrices, les éléments de réponse à l'AR (RARE) (Nezzar *et al.*, 2007). L'induction de la transcription dépendante de cet élément de réponse dépend aussi de l'habilité de l'hétérodimère à recruter les co-activateurs, qui forment des complexes protéiques fournissant plusieurs activités enzymatiques (acétylases et kinases) (Lefebvre, 2001).

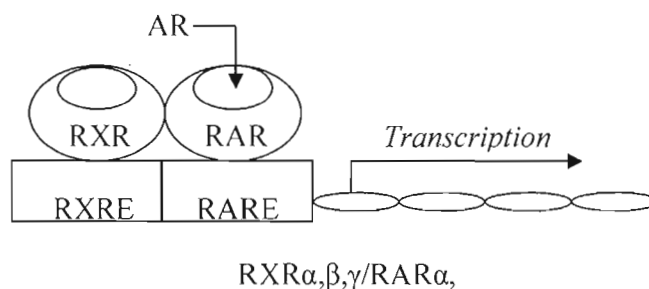


Figure 1.5: Activité nucléaire de l'AR. Le récepteur RAR (α,β,γ) agit en hétérodimère avec le récepteur RXR (α,β,γ) comme facteur de transcription sur l'élément de réponse à l'AR (RARE) lors de la liaison de l'AR. Adapté de Napoli (1999).

1.2.3.4 Inactivation de l'AR en produits solubles.

Une fois son action transcriptionnelle effectuée, l'AR est séquestré par la protéine CRABP. Le complexe est dirigé vers le réticulum endoplasmique où il sera reconnu et métabolisé en produits plus solubles par des enzymes dépendantes du NADP(H) de la famille des cytochromes *P450* (Figure 1.4).

Les molécules non liées à la CRABP seront plutôt reconnues par l'UDP-glucuronyl transférase qui catalyse, avec l'aide de la coenzyme UDPGA (Acide 5'-diphosphoglucuronique uridine), la synthèse du retinoyl- β -glucuronide, produit davantage polaire. L'UDP-glucuronyl transférase ne reconnaît pas le CRABP-AR comme substrat, signifiant que ce type de catabolisme s'applique majoritairement dans les cellules n'exprimant pas la protéine de transport cellulaire (hépatocytes, cellules de la muqueuse intestinale). Puisque la plupart des tissus exprime la CRABP, les processus d'oxydation effectués par les CYP450 sont les plus courants (Napoli, 1999). Les membres de la famille CYP26 (P450RAI) sont ceux dont l'activité catabolique est la plus importante en ce qui a trait à l'AR. Les produits de l'action directe de ces enzymes sont l'acide *tout-trans*-4-hydroxy-rétinoïque et l'acide *tout-trans*-4-oxo-rétinoïque. Enfin, l'isoforme 4-oxo-AR est aussi susceptible à l'isomérisation naturelle en 13-*cis*-4-oxo-AR. En plus faibles quantités, d'autres produits polaires tels les acides *tout-trans*-18-hydroxy, *tout-trans*-14-hydroxy et 5,6-époxy rétinoïques sont aussi formés (Boily *et al.*, 2004; Napoli, 1999; Nezzar *et al.*, 2007). Les produits solubles résultant du catabolisme enzymatique de l'AR peuvent être éliminés ou réutilisés, selon le besoin.

L'impact de la fixation de l'AR à son récepteur nucléaire est large. En plus de stimuler la transcription des protéines associées aux effets des rétinoïdes, le système rétinoïque est fortement régulé par ses propres composantes. À sa liaison, AR favorise, au besoin, la transcription de l'ensemble des protéines nécessaires au bon déroulement du métabolisme de la vitamine A soit, les enzymes de synthèse (LRAT, ARAT, HER, RDH, ADH, RALDH), les protéines de transport (CRABP, CRBP), les enzymes cataboliques (CYPs) ainsi que les récepteurs nucléaires (RXR, RAR). Par exemple, une forte concentration en AR au niveau du noyau stimule la transcription des enzymes d'estérification et d'entreposage de façon à rétablir les concentrations cellulaires d'AR.

L'AR, par sa concentration, régule donc lui-même son propre métabolisme depuis la conversion des formes estérifiées en formes circulantes du ROH jusqu'à l'inactivation de l'AR en métabolites polaires (Napoli, 1999).

1.2.4 Interactions moléculaires dans le catabolisme de l'AR.

Par son implication incontournable dans le développement embryonnaire, le métabolisme de l'AR a souvent été ciblé lors d'études toxicologiques pour tenter d'expliquer certaines anomalies du développement. Ces recherches ont permis d'identifier certaines molécules ayant le pouvoir d'interférer dans le métabolisme normal de l'AR.

1.2.4.1 Stimulation du métabolisme.

1.2.4.1.1 Le TTNPB, un analogue du *tt*-AR.

Les premières évidences sur le potentiel de l'AR à engendrer la multiplication ou l'absence de membres sont survenues lors d'études sur un modèle aviaire (Hoffmann et Eichele, 1994). Suite à ces découvertes, plusieurs chercheurs ont souhaité rapporter ces effets sur différents modèles biologiques et par divers isomères de l'AR. C'est ainsi qu'une étude a été mise sur pied pour *Xenopus laevis*, et l'efficacité du *tt*-AR, du PR et de l'acide (E)-4-[2-(5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-naphthylényle)-1-propényle] benzoïque (TTNPB), un analogue fonctionnel de l'AR et un activateur synthétique spécifique des RAR, à provoquer des anomalies au niveau des membres a été démontrée. Le TTNPB est une molécule stable, contrairement à l'AR et peut engendrer des malformations suite à une très courte exposition (Gardiner *et al.*, 2003). Chez la souris, des bourgeons de membres en développement ont été exposés au TTNPB, ce qui a permis de découvrir que la molécule se lie à la protéine CRABP, qu'elle résiste à l'oxydation et qu'elle prolonge l'activation des récepteurs RAR (Pignatello *et al.*, 1997). Il est également un fort activateur de l'isoforme CYP26, responsable du catabolisme de l'AR en métabolites polaires (Lemaire *et al.*, 2005).

1.2.4.1.2 L'acide méthoprène, un analogue de l'acide 9-*cis* rétinoïque.

L'acide méthoprène est un dérivé métabolique du méthoprène, un insecticide agricole analogue de l'hormone juvénile. Cette molécule est un régulateur de croissance qui interfère dans le processus de maturation par lequel les insectes passent du stade des œufs au stade adulte. Il a été démontré que le pesticide fixe avec une affinité spécifique certaines isoformes des récepteurs RXR, hétérodimères obligatoires de RAR, sur une lignée cellulaire de mammifère, ce qui pourrait stimuler la transcription génique par RARE. Toutefois, ni le méthoprène ni l'acide méthoprène, testés à différentes concentrations n'ont provoqué d'anomalies morphologiques chez la grenouille léopard (Harmon *et al.*, 1995).

1.2.4.1.3 Les pesticides organochlorés.

L'étude de Lemaire *et al.* (2005) a montré que certains pesticides organochlorés activent spécifiquement les récepteurs RAR humains. Puisque les pesticides organochlorés ont des effets tératogènes bien connus chez les animaux (Gupta *et al.*, 1978; Ottolenghi *et al.*, 1974), ces résultats supportent l'hypothèse que les malformations des membres observées en milieu agricole peuvent être dues à des substances interférant dans les phénomènes moléculaires du métabolisme et dans la signalisation de l'AR. Plus spécifiquement, il semble que le chlordane, la dieldrine, l'aldrine, l'endrine et l'endosulfane activent les récepteurs RAR de types α et γ . Considérant la persistance des pesticides organochlorés dans l'environnement, ces résultats tentent à appuyer l'hypothèse que l'augmentation du taux de malformations des membres puisse être due à une exposition prolongée aux pesticides organochlorés (Lemaire *et al.*, 2005).

1.2.4.2 Inhibition du métabolisme.

1.2.4.2.1 Les fongicides « azoles ».

Certaines molécules sont connues pour inhiber le *CYP450* responsable de la 4-hydroxylation de l'AR. Ces substances font souvent partie de la grande famille des « azoles », des fongicides industriels, pharmaceutiques et agricoles, entre autres. Le kétoconazole et le clotrimazole, inhibant la majorité des *CYP450* de façon non spécifique, sont donc aussi actifs sur l'isoforme *CYP26* responsable du catabolisme de l'AR. Les fongicides triazoles, une sous-famille, représentent aussi de bons inhibiteurs, d'autant plus que leur action est très sélective à *CYP26*, comparativement aux précédents (Menegola *et al.*, 2006). Ces substances peuvent nuire à l'activité catabolique au niveau de la cellule. Certaines substances ont, d'un autre côté, un pouvoir inhibant sur la synthèse même des enzymes sur lesquelles repose l'oxydation de l'AR. C'est le cas du *p,p'*-DDE, un des métabolites les plus persistants du DDT qui diminue de façon dose-dépendante l'expression génique des *CYP26* chez la grenouille rousse (Leiva-Presa *et al.*, 2006).

1.3 MISE AU POINT D'UN BIOMARQUEUR D'EXPOSITION.

Suivant l'objectif de la mise sur pied d'un biomarqueur d'exposition à la contamination agricole, le projet Ouaouaron qui s'échelonne depuis 2003 dans le bassin versant de la rivière Yamaska, a déjà montré des effets néfastes sur l'homéostasie des rétinoïdes. La rivière Yamaska est la plus polluée de la province du Québec et les extraits d'eau de surface, analysés pour plus de 53 pesticides, révèlent principalement de l'atrazine et du métolachlore à des concentrations de l'ordre du µg/L (Annexe 2). L'échantillonnage des ouaouarons a été fait dans des sites exposés à différentes intensités d'activité agricole. Dès la première année, les profils hépatique et plasmatique des rétinoïdes ont révélé des résultats différents entre les sites (Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2009).

Des concentrations significatives de ROH et de 13-*cis*-4-oxo-AR, un métabolite secondaire du catabolisme de l'AR, ont été retrouvées dans le plasma des ouaouarons et les taux de 13-*cis*-4-oxo-AR ont été significativement différents entre les sites. Au niveau de l'entreposage hépatique, les concentrations en ROH étaient significativement plus basses chez les individus provenant d'un site contaminé comparativement à un site de référence. D'après ces premiers résultats sur le dosage simple des rétinoïdes, l'activité métabolique hépatique semble être affectée par des conditions locales, telles que l'exposition à l'ensemble des contaminants et fertilisants agricoles retrouvés dans les milieux aquatiques. La tendance des métabolites sanguins à être en plus grandes quantités dans les sites fortement contaminés pousse aussi à croire que le catabolisme de l'AR est stimulé par la présence des pesticides. De façon à cerner davantage le(s) processus altéré(s) donnant lieu à ces résultats, le présent projet suggère un second biomarqueur, cette fois de type métabolique. Selon l'hypothèse de l'implication de l'AR dans les malformations observées sur le terrain, les déséquilibres rétinoïques pourraient être dus à une stimulation de l'activité *P450*. Malgré la présence simultanée de contaminants inducteurs et inhibiteurs, le bilan des effets engendrés par la « soupe » de pesticides à laquelle les organismes sont exposés serait une augmentation de l'activité *P450* et donc une élimination plus rapide de l'AR cellulaire.

En analysant le potentiel d'oxydation de ces enzymes dans le foie des ouaouarons, il serait possible de déterminer s'il y a bel et bien un déséquilibre dans le catabolisme enzymatique expliquant les profils de rétinoïdes obtenus depuis 2003. Par la suite, l'essai mis au point pourra servir de biomarqueur d'exposition considérablement fiable pour le modèle amphibien choisi.

1.4 EXPLORATION DU MÉTABOLISME DE L'AR SUR UN MODÈLE CELLULAIRE

1.4.1 Mise en contexte

L'étude des conséquences physiologiques d'une exposition aux pesticides et fertilisants agricoles chez le ouaouaron permet d'avoir une idée générale de l'état de santé des organismes vivant en milieu agricole. Toutefois, plusieurs paramètres sont hors contrôle lors d'une étude sur le terrain. Dans l'optique de mieux isoler les phénomènes rétinologiques susceptibles d'être altérés par les contaminants agricoles et d'éventuellement obtenir des réponses plus précises aux différentes hypothèses, la deuxième partie de ce projet de maîtrise visait à explorer le métabolisme de l'AR sur un modèle cellulaire, en laboratoire. Une fois le métabolisme bien établi, il sera possible de faire des expositions *in vitro* à divers contaminants et mélanges de ceux-ci et enfin procéder à l'ensemble des analyses nécessaires, sans restriction quant à la quantité de matériel biologique. Puisqu'il n'existe à ce jour aucune lignée cellulaire issue des amphibiens, la lignée cellulaire P19 de carcinome embryonnaire de souris a été sélectionnée comme matériel biologique pour cette partie du projet. Ce choix est tout à fait justifié puisque les cellules P19 expriment et répondent de façon naturelle aux différentes molécules, enzymes et récepteurs nucléaires rétinologiques d'intérêt.

1.4.2 Généralités

Les cellules de carcinome embryonnaire (EC) représentent un système très similaire à celui des cellules souches embryonnaires (ES). Ce sont des cellules souches issues de tumeurs malignes, les tératocarcinomes (Loubet et Fiszman, 1998). Les cellules P19 isolées par McBurney et son équipe en 1982 (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982) dérivent d'un tératocarcinome produit par la greffe d'un embryon de souris de 3 jours dans des testicules de rat adulte. Ces cellules sont indifférenciées et en présence de sérum, elles peuvent croître continuellement et conserver leur statut pluripotent. De la même façon que les cellules de type ES, elles peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules (Martin, 1975).

Les molécules les plus efficaces dans l'induction de la différenciation des P19, à des concentrations non cytotoxiques, sont l'AR et le diméthylsulfoxyde (DMSO) (McBurney *et al.*, 1982). Une concentration de 0,5% DMSO induit la différenciation cardiaque (Paquin *et al.*, 2002) alors que l'AR induit la différenciation neuronale (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982).

Au niveau nucléaire, l'AR initie une cascade d'événements débutant par la liaison de la molécule active à son récepteur nucléaire, comme précédemment expliqué (**Figure 5**) à la seule différence que les cellules P19 expriment deux des trois isoformes de récepteurs à AR, soit RAR α et RAR γ . Six jours après l'induction à des concentrations d'AR variant de 0,3 à 1,0 μ M, les neurones représentent le premier et le plus abondant type cellulaire formé. Dans une proportion moindre, des cellules gliales et des cellules semblables aux fibroblastes peuvent aussi se former (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982). Les cellules EC P19 constituent donc un outil intéressant pour l'étude *in vitro* du développement embryonnaire.

1.4.3 Catabolisme de l'AR

Le métabolisme de l'AR par les cellules P19 et par les microsomes de ces cellules a été partiellement établi par (Sonneveld *et al.*, 1999). En moins de 4 à 6 heures, l'oxydation du *tt*-AR est déjà bien amorcée et le taux d'oxydation peut être suractivé suite à un prétraitement à l'AR. Le catabolisme de l'AR donne lieu à cinq métabolites différents, notamment l'acide 4-hydroxy-rétinoïque qui est le métabolite majeur formé ainsi que l'acide 18-hydroxy-rétinoïque et l'acide 4-oxo-rétinoïque, deux métabolites secondaires. Les cellules F9 de type EC représentent un autre modèle cellulaire capable de métaboliser aisément l'AR et ce métabolisme a déjà été bien établi par (Williams et Napoli, 1985). Le catabolisme de l'AR par ces cellules s'apparente assez bien à celui décrit précédemment. Le métabolisme oxydatif de l'AR par les cellules de type EC semble être bien conservé.

1.5 OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES

Beaucoup d'études rapportent des effets délétères de contaminants d'origine agricole sur le développement et la morphogénèse des amphibiens. Cependant, on n'a encore que peu d'informations sur le mécanisme de toxicité de ces contaminants. L'implication d'un déséquilibre de l'homéostasie de la vitamine A dans les anomalies du développement chez les amphibiens vivant en milieu agricole est un fait bien établi. Les malformations des membres observées sur le terrain semblent être provoquées plus particulièrement par un déséquilibre dans les concentrations cellulaires d'AR disponibles pour l'action génique, provoquant une organogénèse anormale. Dans cet ordre d'idée, une altération de l'activité des enzymes du métabolisme de l'AR serait une hypothèse plausible au phénomène de malformations des membres.

Les enzymes du cytochrome *P450*, qui régulent les concentrations cellulaires d'AR en inactivant les molécules d'AR déjà utilisées au niveau du noyau, sont une cible de choix pour les contaminants agricoles. En effet, les enzymes de la famille des *CYP450* sont des protéines dites « détoxifiantes », mobilisées et impliquées au premier plan dans les processus d'inactivation des contaminants de tout type. L'étude comparative de l'oxydation de l'AR par les *CYP450* chez des amphibiens provenant d'habitats exposés à un gradient de contamination agricole pourrait donc fournir des informations pertinentes quant aux effets néfastes des pesticides et fertilisants sur le métabolisme de l'AR, et donc sur le développement anormal des organismes. Toutefois, le métabolisme des rétinoïdes étant relativement complexe, les cibles d'altérations métaboliques par les contaminants sont nombreuses. C'est pour cette raison qu'un deuxième volet s'est inscrit à ce projet. Grâce à l'utilisation d'un modèle cellulaire répondant de façon naturelle à la signalisation de l'AR et ses récepteurs nucléaires spécifiques, l'étude des voies d'altérations possibles serait grandement facilitée.

En réduisant au maximum les biais relatifs aux études sur le terrain, l'exposition *in vitro* pourrait ultérieurement générer des conclusions solides, de façon rapide et simple. Dans cette optique, les objectifs et hypothèses de la présente étude sont les suivants:

I – Faire une comparaison du profil catabolique de l'AR chez le ouaouaron à celui publié pour d'autres vertébrés. Puisque très bien conservé chez les vertébrés, le métabolisme de l'AR chez le ouaouaron devrait être similaire à celui des poissons, des oiseaux et des mammifères. Faire une comparaison du profil du catabolisme de l'AR chez le ouaouaron mâle à celui chez la femelle. L'échantillonnage des spécimens ayant lieu lors de la période de reproduction des ouaouarons (juin et juillet), le métabolisme général chez la femelle devrait être majoré par rapport à celui du mâle, une grande quantité d'énergie étant requise pour la fabrication des œufs.

II – Faire une comparaison du profil catabolique de l'AR chez le ouaouaron selon le gradient de l'intensité de l'activité agricole entourant les 6 sites d'échantillonnage. Certains pesticides, comme l'acide méthoprene et les organochlorés, sont bien connus pour induire la transcription et l'activité des CYP450. Toutefois, ces contaminants ne se retrouvent qu'en très faible concentration dans les sites d'échantillonnage étudiés. L'analyse *in vitro* de la capacité d'oxydation de l'AR permettra de comparer les taux de métabolites formés selon le gradient d'exposition des animaux. S'il s'avère que les niveaux de métabolites formés soient plus élevés chez les ouaouarons provenant des sites les plus contaminés, cela suggérera que le « mélange » de contaminants a bel et bien un effet inducteur sur l'activité globale des CYP450.

III – Reproduire et optimiser un protocole d'oxydation de l'AR sur un modèle cellulaire: les cellules de carcinome embryonnaire de souris P19. L'oxydation de l'AR par les cellules P19 a déjà été étudiée dans le cadre de recherches antérieures (Solari *et al.*, 2010; Sonneveld *et al.*, 1999). Le suivi de l'oxydation de l'AR dans les cellules P19 permettrait de vérifier si une perturbation de ce métabolisme peut se produire tôt dans le développement embryonnaire.

CHAPITRE II

ÉTUDE DU CATABOLISME HÉPATIQUE DE L'ACIDE
RÉTINOÏQUE CHEZ LE OUAOUARON (*RANA CATESBEIANA*):
EFFETS DE LA CONTAMINATION AGRICOLE

Janik Thibodeau et Monique Boily

**Centre de recherche TOXEN et Département des sciences biologiques
Université du Québec à Montréal
Montréal, Québec**

**Article à être soumis à la revue:
Toxicology in vitro**

2.1. RÉSUMÉ

Depuis les 30 dernières années, le déclin des populations et espèces d'amphibiens est un problème bien réel. La contamination par les pesticides et fertilisants agricoles semble être l'une des causes principales à ce déclin, d'autant plus qu'une augmentation de l'émergence des cas de grenouilles difformes a été rapportée. Les anomalies répertoriées rappellent fortement celles induites par un débalancement des concentrations effectives d'acide rétinoïque (AR). L'AR est le métabolite actif de la vitamine A (rétinol: ROH), un micronutriment endogène impliqué dans le positionnement de l'axe antéropostérieur lors de la formation des membres durant l'embryogénèse. L'influence de l'AR sur l'organogénèse dépend de sa concentration cellulaire disponible pour son action sur la transcription génique. Une enzyme du cytochrome *P450* (*CYP26*) régule ces concentrations en inactivant l'AR en métabolites polaires. Selon l'hypothèse que la contamination agricole puisse altérer l'efficacité de cette enzyme, l'activité catabolique sur l'AR par des microsomes hépatiques de ouaouarons mâles et femelles exposés à un gradient d'activité agricole a été investiguée. La caractérisation partielle de l'activité enzymatique a permis de révéler un substrat préférentiel, l'acide 13-*cis*-rétinoïque, ainsi que des valeurs de paramètres cinétiques ($K_m = 85\mu\text{M}$; $V_{max} = 4,14\text{nmole/mg prot./h}$). La comparaison de la réponse enzymatique entre les sexes a dévoilé une activité plus importante chez les mâles. Pour les deux sexes, l'oxydation de l'AR tendait à être plus élevée dans les sites les plus contaminés. De plus, des mesures morphométriques (longueur museau-cloaque) ont été comparées et pourraient suggérer des problèmes de croissance chez les ouaouarons provenant des sites fortement contaminés. Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans cette étude supportent l'hypothèse d'une altération dans l'efficacité catabolique des *CYP450* sur l'AR, un phénomène pouvant donner lieu aux malformations observées en milieu agricole.

Mots-clés: Acide rétinoïque, acide 4-oxo-rétinoïque, cytochrome *P450*, *Rana catesbeiana*, microsomes hépatiques, contaminants agricoles.

2.2. INTRODUCTION

Depuis une trentaine d'années on constate une diminution importante de l'abondance des espèces et des populations d'amphibiens à travers le monde. Parallèlement à ce déclin, on observe, dans les habitats aquatiques des zones agricoles intensives, une augmentation du nombre de grenouilles présentant des malformations (Ouellet *et al.*, 1997). Ces anomalies, qui varient de l'absence à la multiplication de certaines structures, touchent particulièrement les membres postérieurs des amphibiens (Johnson *et al.*, 2002; Lannoo *et al.*, 2003; Meteyer *et al.*, 2000; Schoff *et al.*, 2003). Plusieurs causes probables à ces malformations ont été découvertes, comme les radiations UV, les infections parasitaires ainsi que l'exposition à des substances toxiques (Ankley *et al.*, 2004). Les anomalies observées en milieu agricole rappellent fortement celles produites en laboratoire où des chercheurs ont fait varier la concentration d'acide rétinoïque (AR) chez des embryons d'oiseaux et de grenouilles (Hoffmann et Eichele, 1994; Satre et Kochhar, 1989; Sulik et Dehart, 1988). Comme certains contaminants de types 'azole' et organochloré, entre autres, sont déjà connus pour interférer dans le métabolisme de l'AR (Boyer *et al.*, 2000; Gilbert *et al.*, 1995; Lemaire *et al.*, 2005; Menegola *et al.*, 2006), force est de croire que la contamination agricole pourrait causer ce même genre de complications.

L'AR est le métabolite actif du ROH, un micronutriment endogène essentiel à la croissance et au développement des vertébrés. L'organogénèse est influencée par l'action d'enzymes métaboliques contrôlant la formation de l'AR à partir du ROH. Le métabolisme de l'AR se fait en deux étapes durant lesquelles le ROH est d'abord oxydé en rétinaldéhyde, qui est à son tour oxydé en AR (Duester, 2008). L'AR est une petite molécule morphogène qui, par son rôle de facteur de transcription génique, orchestre le patron de segmentation lors de la formation des membres chez les vertébrés (Eichele, 1989; Yashiro *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2009).

Les effets de l'AR sont produits grâce à sa liaison à deux types de récepteurs nucléaires qui lient l'ADN en tant qu'hétérodimères: les récepteurs de l'AR (RAR) et les récepteurs des rétinoïdes X (RXR). L'AR actif fixe le partenaire RAR de l'hétérodimère et, selon une concentration précise, stimule la transcription de gènes spécifiques, influençant la morphogenèse. La concentration de l'AR au niveau de la cellule nécessite donc une régulation très fine pour éviter un débalancement pouvant donner lieu, par exemple, à des malformations au niveau des membres (Mazurais *et al.*, 2009). Chez l'ensemble des vertébrés (Holleman *et al.*, 1998; Ray *et al.*, 1997; White *et al.*, 1996), cette responsabilité a été attribuée, en grande partie, à une isoforme de la famille des cytochromes *P450* (*CYP26*), qui inactive l'AR en acide 4-hydroxy-rétinoïque (4-OH-AR), métabolite majeur de l'AR et en acide 4-oxo-rétinoïque (4-oxo-AR) (White *et al.*, 2007). La polarité augmentée de ces molécules par rapport à l'AR leur permet de regagner la circulation sanguine et d'être ultérieurement éliminées. Le métabolite 4-oxo-AR a été reconnu pour manifester une forte affinité envers les récepteurs RAR modulant ainsi la spécification positionnelle chez l'embryon amphibien (Pijnappel *et al.*, 1993).

Le dosage des rétinoïdes a été largement utilisé comme biomarqueur de contamination environnementale, autant chez les poissons (Arcand-Hoy et Metcalfe, 1999), les amphibiens (Bérubé *et al.*, 2005; Leiva-Presa *et al.*, 2006), les oiseaux (Champoux *et al.*, 2006; Kuzyk *et al.*, 2003), que chez les mammifères (Murk *et al.*, 1998). Toutefois, les mécanismes cellulaires sous-jacents aux déséquilibres rétinoïdiens, ainsi que le rôle de certains contaminants sur ces mécanismes, restent encore mal connus.

L'objectif principal du présent projet est de vérifier le potentiel perturbateur d'un milieu contaminé par les pesticides et fertilisants sur le catabolisme de l'AR mesuré dans les microsomes hépatiques de ouaouaron. De récentes études sur le ouaouaron ont révélé des débalancements non négligeables dans les niveaux de rétinoïdes plasmatiques et hépatiques, phénomène lié à l'intensité de l'activité agricole avoisinante. De plus, des concentrations significatives de 13-*cis*-4-oxo-AR, un isomère du métabolite 4-oxo-AR, ont été dosées dans le plasma des grenouilles, des concentrations augmentant dans le même sens que l'exposition aux contaminants agricoles (Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2005). Récemment, Boily *et al.*, (2009) ont montré que dans les sites les plus contaminés, l'efficacité des enzymes LRAT et HER des grenouilles, impliquées dans l'entreposage et la mobilisation des rétinoïdes hépatiques, était fortement altérée. Étant donné ces résultats, notre hypothèse générale suggère que les contaminants agricoles altèrent l'activité *P450* et, par conséquent, l'oxydation de l'AR en métabolites, influençant alors les concentrations (à la hausse ou à la baisse) d'AR disponibles pour la liaison aux récepteurs nucléaires, une situation potentiellement tératogène. Étudiée pour la première fois chez *Rana catesbeiana*, l'oxydation de l'AR par les microsomes hépatiques a été partiellement caractérisée et l'efficacité de deux isomères de l'AR testée. La présente étude permettra, entre autres, de comparer le catabolisme de l'AR chez un modèle amphibien à celui mieux connu chez les mammifères (Ray *et al.*, 1997; Solari *et al.*, 2010).

2.3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.3.1 Produits chimiques.

Les étalons d'AR *tout-trans* (*tt*-AR) et 13-*cis* (13-*cis*-AR), l'hydroxytoluène butylé (BHT), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), l'albumine de sérum bovin (BSA) et les inhibiteurs clotrimazole et kétoconazole ont été achetés chez Sigma-Aldrich Chemicals (St-Louis, MO, USA). Tous les solvants utilisés étaient de qualité HPLC et ont été obtenus chez Fisher Scientific (Montréal, Québec, Canada). Le MS222 (tricaïne méthanesulphonate) a été acheté chez ICN Biochemicals (Irvine, CA, USA).

2.3.2 Sites d'échantillonnage.

Durant les étés 2007 et 2008, les ouaouarons ont été échantillonnés dans 6 sous-bassins distincts à l'intérieur du bassin versant de la rivière Yamaska, Québec, Canada. Ces sites ont été sélectionnés selon la surface de leur territoire occupé par la culture à grandes interlignes (maïs et soya), comme décrit dans Spear *et al.*, (2009). Deux sites sont associés à une faible activité agricole (0-19% de la surface cultivable utilisée): Deborah Stairs (DS) et Lac Boivin (LB). Les rivières Pot-au-Beurre (PB) et Yamaska, dans la municipalité de Farnham (FA) et le réservoir Choinière, faisant partie du Parc national d'Oka (CH) sont classés comme étant modérément contaminés (20-59% du territoire cultivable utilisé). Le site représentant une forte contamination agricole est celui de Rivière Noire (RN), où 60% des terres sont en culture et où la production porcine est importante.

2.3.3 Capture des animaux.

Les ouaouarons ont été capturés selon la méthode précédemment décrite (Boily *et al.*, 2005; Spear *et al.*, 2009) en accord avec le permis émis par l'Université du Québec à Montréal et le ministère des Ressources naturelles et de la faune (MRNF), Gouvernement du Québec. Les animaux ont été anesthésiés dans une solution de MS222 (0,1%) tamponnée avec 0,2% de NaHCO₃ et euthanasiés par luxation cervicale. La longueur museau-cloaque (LMC) et le poids ont été notés pour chaque animal. Le foie a été rapidement retiré, pesé, congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'aux analyses.

2.3.4 Extraction des microsomes.

Toutes les étapes de l'extraction des microsomes ont été effectuées sous lumière jaune entre 0 et 4°C selon un protocole modifié de Boily *et al.*, (2003). Le tissu hépatique (0,5g) a été homogénéisé dans 2ml de tampon Tris-KCl (0,15M KCl, 50mM Tris-HCl, pH 7,4). L'homogénat a subi une ultracentrifugation à 10 000 x g pendant 20 min et le surnageant résultant a été centrifugé à 100 000 x g durant 1h. Le culot a été rincé et resuspendu dans 200µl de tampon (0,25M sucrose, 0,15M KCl, 50mM Tris-HCl, pH 7,0) pour les essais enzymatiques. Une fois préparés, les microsomes de foie ont été entreposés à -80°C, immédiatement après avoir été surgelés dans l'azote liquide. La concentration protéique a été déterminée selon la méthode de Bradford *et al.*, (1976) en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard.

2.3.5 Caractérisation partielle de l'activité enzymatique.

La détermination des paramètres de base pour les essais enzymatiques a été effectuée sur un « pool » de microsomes en solution provenant de chacun des spécimens, tous sites et années confondus. La concentration protéique, le temps d'incubation, les concentrations effectives de substrats et d'inhibiteurs ont été étudiés dans le but d'optimiser la réponse enzymatique.

La présence du cofacteur enzymatique a été jugée nécessaire puisque qu'une réponse enzymatique significativement plus élevée a été observée à une concentration aussi faible que 0,8mM NADPH comparée à un milieu de réaction sans ce cofacteur ($t=25,13$; $p<0,0001$) (résultats non montrés). La température d'incubation sélectionnée était 27°C, un choix basé sur la température optimale pour cette espèce. Les valeurs des paramètres K_m et V_{max} ont été optimisées en régression non linéaire par l'approche des moindres carrés à l'aide du Macro complément *Solver* du programme Excel 2007 (Microsoft, Washington, États-Unis).

2.3.6 Essais enzymatiques et dosage des produits de la réaction.

Toutes les manipulations ont été effectuées sous lumière jaune de façon à prévenir l'isomérisation des rétinoïdes. Les essais enzymatiques ont été faits selon la méthode de Doyon *et al.*, (1999), légèrement modifiée. Des essais sans substrat ont été faits, mais aucun métabolite n'a été produit de façon endogène. Une solution-mère de *tt*-AR ou de 13-*cis*-AR à 3,0mM a été diluée dans du méthanol 100% et conservée à -20°C. L'intégrité des solutions a été régulièrement testée en mesurant l'absorbance au spectromètre et par injection au HPLC. Un aliquot de la solution-mère (20µl) a été ajouté à chacun des tubes de réaction en verre (borosilicate 12 ml avec bouchon vissable) contenant le mélange réactionnel (50mM Tris-HCl, 0,15M KCl, 1,5mM BSA, 5mM MgCl₂, pH 7,4). Les microsomes ont été décongelés sur glace durant environ 20min et 45µl (≈ 225 µg de protéines) de la suspension microsomale ont été ajoutés à chaque tube. Les tubes ont été mélangés 5sec et préincubés, sans agitation, à 27°C durant 3min. La réaction a été initiée par l'ajout du cofacteur NADPH en solution (0,8mM) dans un volume d'incubation total de 575µl. La réaction s'est effectuée à 27°C, sous agitation constante, durant 40min et stoppée en plongeant les tubes dans la glace et en ajoutant 1ml d'acétate d'éthyle-BHT (0,01%) froid. Les tubes ont été mélangés 30sec, centrifugés durant 5min (1000 x g) et 700µl de la phase organique supérieure ont été transférés dans une deuxième série de tubes.

L'extraction a été répétée et 900µl de la phase organique ont été ajoutés aux 700µl de la première extraction. Les fractions jumelées ont été complètement évaporées à sec au moyen d'un évaporateur rotatif (Vacufuge® plus, Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne) durant 15min à 45°C. Les tubes ont ensuite été scellés sous azote et conservés à -20°C jusqu'à l'injection par HPLC (3h maximum). Dix minutes avant le dosage au HPLC, 200 µl de méthanol ont été ajoutés aux tubes, ensuite équilibrés à la température de la pièce avant les injections.

Un volume de 40µl a ensuite été injecté dans un système HPLC à phase inversée de marque Waters, équipé d'un programme Millenium 32, d'une pompe modèle 510, d'un détecteur modèle 486 ajusté à 350nm et d'un injecteur 7725i, Rheodyne. Les rétinoïdes ont été séparés sur une colonne analytique Inertsil C-18 (Ultrasphere 4.6 x 150mm, 5µm) selon un gradient d'élution entre le solvant A (50% acétonitrile, 50% eau contenant 0,02M d'acétate d'ammonium et 0,5% d'acide acétique) et le solvant B (90% acétonitrile, 10% eau contenant 0,1M d'acétate d'ammonium et 0,4% d'acide acétique). La vitesse de circulation des solvants était de 1,5ml/min et suivait le patron suivant: 100% solvant A initial suivi d'un gradient linéaire pour passer à 100% B d'une durée de 12min. Après 3 min avec le solvant B, un gradient linéaire de 3min a été utilisé pour revenir à 100% A, maintenu pour 2min. Dans ces conditions, le temps de rétention du *tt*-4-oxo-AR était de 6,5min, celui du 13-*cis*-4-oxo-AR était de 6,7min et celui du *tt*-AR de 18,5min. Cette méthode assure l'élution du substrat 13-*cis*-AR (17,4min) en excès à chaque injection, prévenant son accumulation dans la colonne analytique. Les pics des substrats ont été identifiés et quantifiés à l'aide d'étalons achetés, tandis que les pics de métabolites polaires l'ont été à l'aide de métabolites synthétisés par radiation UV sur le *tt*-AR dans une solution d'heptane iodée selon la méthode de McKenzie *et al.*, (1979), suivie d'une purification sur colonne C-18.

2.3.7 Essais des inhibiteurs.

Pour déterminer le rôle de l'activité *CYP450* dans les essais enzymatiques, des incubations ont été faites en présence de clotrimazole et de kétoconazole, deux inhibiteurs non spécifiques de l'activité *P450*. Les inhibiteurs ont été dissouts dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à des concentrations variant entre 0 et 100 μ M et de façon à ce que les concentrations totales de DMSO dans les tubes n'excèdent jamais 3%. Un volume de 45 μ l de suspension microsomale a ensuite été ajouté aux tubes. Les tubes ont été mélangés et préincubés pendant 10min à 27°C sous agitation constante. L'incubation, l'extraction et le dosage par HPLC ont été effectués comme décrit dans la section précédente.

2.3.8 Analyses statistiques.

Les valeurs moyennes de la LMC, de la concentration de protéines microsomales, du poids du foie et de l'activité catabolique ont été testées pour déceler des différences entre mâles et femelles avec un test « *t* » de Student, assumant des variances inégales. Les valeurs moyennes de la LMC, du poids du foie et de l'activité enzymatique ont été comparées entre les sites par des analyses de variance à un critère de classification (ANOVA). Lorsque le modèle était significatif, un test de comparaisons multiples (Tukey) a été réalisé. Des corrélations de Spearman ont été réalisées pour les années et les sexes entre les paramètres suivants: LMC, poids du foie, concentration des protéines microsomales et activité catabolique. Au besoin, les données ont été transformées en \log_{10} pour permettre la normalité des résidus et l'homoscédasticité des résidus absolus. Seules les grenouilles sexuellement matures ont été sélectionnées pour les analyses statistiques. La maturité des ouaouarons a été évaluée lors de la dissection et consistait en des organes reproducteurs bien développés, présence d'œufs pour les femelles et de « corps gras » pour les mâles. Certains sites n'ayant pas suffisamment de femelles matures, comme PB, DS et CH pour l'une ou l'autre des années, ont été systématiquement enlevés des comparaisons entre sites. Les analyses statistiques ont été faites au moyen de deux programmes: SPSS® 11.0 et JMP 7.0 (SAS).

2.4 RÉSULTATS

2.4.1 Caractérisation partielle de l'activité enzymatique.

L'activité d'oxydation associée aux microsomes hépatiques du ouaouaron a été testée pour deux isomères de l'AR: *tt*-AR et 13-*cis*-AR. La valeur moyenne de l'activité enzymatique associée au substrat 13-*cis*-AR était significativement plus élevée que celle obtenue avec l'isomère *tt*-AR ($t=11,47$; $p<0,001$) (Figure 2.1A). Suite à ces résultats, l'isomère 13-*cis*-AR a été considéré comme étant le substrat le plus efficace et a donc été sélectionné pour la suite des analyses. Une concentration quantifiable du *tt*-4-oxo-AR était produite avec aussi peu que 15µl de suspension microsomale, correspondant à environ 75µg de protéines (Figure 2.1B). Le taux de réaction était stable à partir de 300µg de protéines, suggérant que toutes les molécules de substrat (pour 0,1mM de 13-*cis*-AR) ont été prises en charge par les enzymes. Donnant un bon rendement enzymatique et ayant un coefficient de variation faible, le volume de 45µl de suspension microsomale (≈ 225 µg de protéines microsomales) a été sélectionné pour les essais enzymatiques. Le catabolisme du 13-*cis*-AR en fonction du temps d'incubation est montré dans la Figure 2.1C. La relation étant linéaire sur 90min et une durée de 40min a été choisie pour la suite des analyses. Avec l'augmentation de la concentration du substrat, la formation du métabolite *tt*-4-oxo-AR suit une courbe Michaelis-Menten typique. La transformation des données en un graphique Lineweaver-Burk permet la mise en évidence du K_m apparent (85µM) et de la V_{max} (4,14nmole/mg prot./h) (Figure 2.1D). Deux inhibiteurs généraux des P450, le clotrimazole et le kétoconazole, ont été testés sur l'activité enzymatique. À des concentrations de 0,5 µM, 1,0 µM et 10µM, le kétoconazole a inhibé la formation du métabolite de façon plus efficace (Figure 2.1E). Toutefois, lorsque les concentrations ont atteint 100µM, 92% de l'activité était inhibée par le clotrimazole, comparativement à seulement 77% en présence du kétoconazole.

2.4.2 Activité enzymatique chez le ouaouaron de la rivière Yamaska.

La production du métabolite 13-*cis*-4-oxo-AR a été dosée et comparée, toutefois, puisque les résultats ne montraient aucune différence entre les sexes et les sites et que le produit majeur de l'oxydation de l'AR était le *11*-4-oxo-AR, seuls les résultats concernant ce métabolite sont discutés ici.

L'efficacité catabolique des microsomes de foie sur l'AR a d'abord été comparée entre les sexes. La Figure 2.2 montre une différence significative entre l'activité chez les mâles et celle chez les femelles en 2008 ($t=3,39$; $p<0,01$), mais seulement une tendance en 2007 ($t=1,50$; $p<0,1$). La réponse enzymatique chez les femelles n'était pas statistiquement différente entre les deux années ($t=0,73$; $p<0,77$), contrairement à celle des mâles ($t=2,86$; $p<0,01$). Les données pour les mâles ont ensuite été testées pour des différences entre les sites d'échantillonnage. En 2007, les mâles provenant du site PB montrent un métabolisme significativement plus faible qu'à tous les autres sites ($F_{5,37}=3,41$; $p<0,05$) (Figure 2.3A). Pour l'échantillonnage de 2008, aucune différence significative n'a été notée entre les sites. Toutefois la production de *11*-4-oxo-AR montre une tendance à l'augmentation selon le gradient de contamination agricole ($F_{5,44}=2,06$; $p<0,1$) (Figure 2.3A). L'analyse statistique des données pour les femelles s'est avérée problématique due au fait que la méthode d'échantillonnage favorisait la capture des mâles sur celle des femelles. Les sites ayant moins de quatre femelles considérées matures n'ont pas été inclus dans les analyses statistiques (voir Matériel et Méthode pour plus de détails). Les données des deux années d'échantillonnage pour les femelles ont été combinées pour tester un «effet du site» sur l'activité enzymatique. La Figure 2.3B montre une tendance à l'augmentation de la réponse enzymatique en parallèle avec la contamination agricole ($F_{3,33}=2,57$; $p<0,1$), similaire à celle observée pour les mâles en 2008. Parce que la réaction s'effectue sur la fraction microsomale des cellules hépatiques, la concentration des protéines hépatiques est susceptible d'influencer le métabolisme de l'AR.

Lorsque comparée entre les sexes, la concentration de protéines microsomales a montré une différence significative, favorisant les femelles, autant en 2007 ($t=1,99$; $p<0,05$) qu'en 2008 ($t=2,27$; $p<0,05$) (Figure 2.4). La comparaison de ces données entre les sites d'échantillonnage n'a montré aucune différence significative pour les mâles (2007: $F_{5,38}=1,27$; $p=0,30$, 2008: $F_{5,46}=1,53$; $p=0,20$) ou les femelles (2007: $F_{3,17}=0,66$; $p=0,59$, 2008: $F_{3,14}=1,07$; $p=0,39$). D'autres paramètres, comme la LMC et le poids du foie ont aussi été testés.

En ce qui concerne la LMC, aucune différence n'a été trouvée entre mâles et femelles en 2007 ($t=0,77$; $p=0,73$) ou en 2008 ($t=0,32$; $p=0,48$). Lorsque les données des deux sexes ont été combinées, les analyses de variance ont révélé qu'au site PB, en 2007, la taille des individus était plus grande que partout ailleurs ($F_{5,62}=4,6$; $p<0,01$) (Tableau 2.I). En 2008, la situation était légèrement différente. Les valeurs de la LMC au site CH étaient significativement plus faibles qu'aux sites LB, DS, PB et FA ($F_{5,66}=3,65$; $p<0,01$). De plus, le site RN montrait une moyenne statistiquement plus faible que celle de LB. Pour le poids du foie des ouaouarons, les données ont d'abord été comparées entre les sexes. Le poids du foie chez les femelles était significativement plus élevé que celui des mâles en 2007 ($t=1,73$; $p<0,05$), résultat renforcé en 2008 ($t=5,74$; $p<0,0001$) (Figure 2.5A). Aucune différence n'a été notée entre les années en ce qui concerne les femelles ($t=1,24$; $p=0,89$), contrairement aux données pour les mâles où les valeurs étaient statistiquement plus faibles en 2008 ($t=4,03$; $p<0,0001$). Les différences entre sites ont démontré qu'en 2007, pour les mâles, le poids du foie était plus élevé à PB qu'à DS, FA, CH et RN ($F_{5,38}=6,62$; $p<0,001$) (Figure 2.5B) alors qu'en 2008, aucune différence significative n'a été observée ($F_{5,38}=1,91$; $p=0,11$). Étant statistiquement semblables pour les deux années, les données pour les femelles ont été combinées pour tester une différence entre sites, mais aucun résultat significatif n'a été obtenu ($F_{4,38}=1,49$; $p=0,23$).

Une influence possible de paramètres comme la concentration en protéines microsomales, le poids du foie, et la LMC sur l'activité d'oxydation mesurée a été vérifiée. Nous avons choisi de tester la LMC plutôt que le poids total des ouaouarons en ce qui a trait aux corrélations statistiques. Ce choix est dû au fait que le poids total de l'animal est parfois biaisé par la présence d'œufs chez les femelles et pour les deux sexes, par le contenu stomacal (jusqu'à 40 g pour certains ouaouarons). Pour les deux années ainsi que pour les deux sexes, le poids du foie était positivement relié à la LMC: 2007, mâles ($r=0,610$, $p<0,001$), femelles ($r=0,922$, $p<0,001$); 2008, mâles ($r=0,664$, $p<0,001$), femelles ($r=0,772$, $p<0,001$). En 2007, l'activité d'oxydation chez les mâles et les femelles était corrélée de façon négative avec la concentration en protéines microsomales (mâles $r = -0,430$; $p<0,05$, femelles $r = -0,505$; $p<0,05$), un résultat qui ne se retrouve pas en 2008. Enfin, la LMC, chez les femelles seulement, était négativement liée à l'activité catabolique et ce, pour les deux années d'échantillonnage: 2007 ($r=-0,457$; $p<0,05$), 2008 ($r=-0,636$; $p<0,005$).

2.5 DISCUSSION

2.5.1 Caractérisation partielle de l'activité enzymatique.

Le catabolisme de l'AR a été étudié chez plusieurs autres vertébrés, entre autres, chez les poissons (Doyon *et al.*, 1999; Boyer *et al.*, 2000) et chez les mammifères (Ray *et al.*, 1997; McSorley et Daly, 2000) mais l'oxydation de l'AR n'avait jamais été étudiée chez le ouaouaron auparavant.

Ce qui distingue notre expérimentation des autres études, est une nette préférence de la forme 13-*cis*-AR sur celle du *tt*-AR comme substrat d'oxydation. Bien que les deux types de métabolites, *tout-trans* et 13-*cis*, aient été dosés dans notre étude *in vitro*, des variations entre sexes et sites d'échantillonnage n'ont été trouvés que pour le métabolite *tt*-4-oxo-AR. Ce résultat est quelque peu surprenant compte tenu que le métabolite 13-*cis*-4-oxo-AR semble être la forme majeure dans le plasma de ouaouarons (Bérubé *et al.*, 2005; Boily *et al.*, 2009). Dans les études bien documentées portant sur le rôle essentiel de l'AR durant le développement embryonnaire des vertébrés, et plus particulièrement des mammifères (Duester, 2008), l'isomère 13-*cis*-AR semble pourtant être un joueur secondaire. Les effets pléiotropiques associés aux rétinoïdes dépendent de la liaison de l'isomère *tt*-AR aux récepteurs nucléaires, car l'affinité de la forme 13-*cis*-AR pour les récepteurs RAR est très faible (Idres *et al.*, 2002). Plusieurs étapes précèdent toutefois la formation du *tt*-AR pour l'activité transcriptionnelle. Une isomérisation tardive des formes « 13-*cis* » en formes « *tout-trans* » au moment de l'entrée de l'AR au niveau du noyau est donc plausible. Selon Armstrong *et al.* (2005), cette isomérisation pourrait être une « stratégie » limitant la sollicitation nucléaire de l'AR et participant à une sorte de régulation.

La réaction enzymatique des microsomes hépatiques sur l'AR s'est trouvée nettement inhibée en présence des deux inhibiteurs, clotrimazole et kétoconazole. Étant donné que ces antifongiques synthétiques de type « azole » sont connus pour leur inhibition non spécifique des CYP450, force nous est de constater que l'activité que nous avons mesurée, dépend donc, du moins en partie, des enzymes du CYP450. Certaines études (Papis *et al.*, 2006; Menegola *et al.*, 2006). ont spécifiquement démontré, chez l'embryon de *Xenopus laevis*, une inhibition du CYP26 par des fongicides du même type (triadiméfon, triadiménol et fluconazole, entre autres), conduisant à des effets tératogènes (Groppelli *et al.*, 2005). Ne pouvant être inactivées de façon efficace, les molécules d'AR actif resteraient disponibles pour stimuler la transcription génique, une situation potentiellement tératogène. Enfin, les connaissances concernant le système des rétinoïdes endogènes du ouaouaron sont limitées et ne permettent pas de signaler les ressemblances entre les résultats obtenus avec une procédure *in vitro* et la situation des ouaouarons en milieu naturel.

2.5.2 Activité enzymatique chez le ouaouaron de la rivière Yamaska

Différences entre les sexes

Plusieurs paramètres analysés montrent une différence statistique significative entre les mâles et les femelles. Le poids du foie et la concentration des protéines microsomaux sont des facteurs qui semblent, selon le sexe ou l'année, influencer le catabolisme de l'AR. Les moyennes représentant le poids du foie et la concentration protéique dans les microsomes hépatiques chez les femelles étaient plus élevées que celle des mâles. Malgré ces résultats, l'activité d'oxydation des microsomes était significativement plus grande chez les mâles.

L'échantillonnage des grenouilles a lieu durant les mois de juin et juillet, période la plus active en ce qui a trait à la reproduction chez le ouaouaron, confirmée par la présence d'œufs matures dans l'abdomen des femelles. La physiologie des femelles durant l'ovogénèse obéit à des types et des concentrations d'hormones différents de celle des mâles (McCreery et Licht, 1983; Daniels et Licht, 1980) et la synthèse protéique globale est stimulée (Schultz et Wassarman, 1977; Hyman et Wormington, 1988; Tannahill et Melton, 1989), augmentant le poids total de l'animal. L'induction générale de protéines métaboliques chez les femelles durant l'ovogénèse pourrait donc expliquer une concentration protéique microsomale et un poids du foie plus élevés. Toutefois l'énergie investie par le métabolisme général des femelles favorise possiblement la maturation des œufs sur le métabolisme des rétinoïdes. De plus, comme une étude sur *Xenopus laevis* l'a démontré (Blumberg *et al.*, 1992), les œufs de grenouilles expriment certains isomères des récepteurs RAR. Une partie de l'AR endogène pourrait donc être sollicitée dans le processus de maturation des œufs. Il pourrait donc être pertinent, dans une prochaine étude, de doser les niveaux d'AR dans les œufs de ouaouarons. Bien que la synthèse des protéines totales soit augmentée, la production spécifique de *CYP* n'en est probablement pas favorisée, ce qui peut expliquer la réponse catabolique sur l'AR plus faible chez les femelles comparativement aux mâles. Une capture de ouaouarons (mâles et femelles) en dehors de la période de reproduction pourrait nous aider à valider cette hypothèse, de même que la mesure de l'ARNm des *CYP*450, plus spécifiquement du *CYP*26, de façon à quantifier la proportion de l'induction influençant réellement l'activité catabolique.

Différences entre les sites d'échantillonnage

Les moyennes des mesures de la LMC n'étaient pas significativement différentes entre les sexes ni entre les sites, c'est donc pourquoi les données ont été combinées pour vérifier un effet du site d'échantillonnage. En 2008, les valeurs moyennes de la LMC étaient significativement plus faibles dans les sites contaminés, comparativement à l'un des sites témoins. Cette observation rejoint les résultats d'une étude récemment publiée sur les mêmes populations de ouaouarons, mais pour des années d'échantillonnage antérieures (Spear *et al.*, 2009) et suggère un déficit de croissance chez les animaux exposés à une forte contamination agricole. Les analyses de corrélations ont démontré une relation négative entre la LMC et l'activité d'oxydation chez les femelles pour les deux années d'échantillonnage. Encore une fois, le stade de maturité des grenouilles pourrait expliquer ce phénomène. En effet, en supposant que les femelles de plus petites tailles étaient immatures pour la plupart, postulat vérifié par la présence d'œufs ou d'organes reproducteurs bien développés, il n'est pas surprenant d'observer un métabolisme accentué de l'AR chez ces animaux en développement. De plus, comme mentionné plus haut, l'utilisation probable de l'AR pour la conception des œufs pourrait expliquer une moindre importance de l'activité catabolique chez les femelles matures.

Lorsque comparées entre les sites, les moyennes de l'oxydation de l'AR pour les mâles et les femelles tendaient à augmenter avec la contamination agricole, sauf en ce qui concerne les mâles en 2007. Comme démontré grâce aux inhibiteurs testés, la réaction catabolique sur l'AR dépend de l'action des cytochromes *P450* sur la molécule active.

Plusieurs pesticides et contaminants, entre autres le méthoxychlore, le 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), les dibenzofuranes, le chlordane et l'endosulfane sont déjà connus pour induire la synthèse de différents types de *CYP450*, et ce, pour plusieurs espèces en laboratoire (Hervé *et al.* 2010; Casabar *et al.*, 2006; Lemaire *et al.*, 2004; Li et Kupfer, 1998). Les résultats obtenus dans notre étude semblent aller dans le même sens; l'efficacité d'oxydation ayant tendance à être plus élevée dans le site le plus contaminé, effet trouvé chez les mâles et les femelles. On peut donc soupçonner que les ouaouarons de notre étude, associés aux sites les plus contaminés, voient leur catabolisme de l'AR augmenter par le biais d'une induction de cytochromes *P450*. De plus, étant capable d'activer les récepteurs nucléaires RAR, le métabolite 4-oxo-AR contribue au déséquilibre lié à la signalisation cellulaire (Pijnappel *et al.*, 1993; Ramp *et al.*, 1994). Comme mentionné plus haut, la présence de pesticides de type «azole» pourrait avoir un effet d'inhibition sur le catabolisme de l'AR. Le bilan des ventes de pesticides au Québec en 2006 des ventes de plus de 50 000 kg d'ingrédients actifs en 2006, ce qui place les fongicides au 2^e rang des ventes (20,7%) (Gorse et Dion, 2009). Le fongicide azolé le plus utilisé au Québec est le propiconazole (Giroux, 2010). La présence de différents pesticides «azole» et la combinaison de leur action inhibitrice avec l'action inductrice des autres types de pesticides pourraient donc donner lieu à des effets potentiellement néfastes sur le développement embryonnaire des organismes dans l'environnement.

La faible oxydation de l'AR chez les mâles en 2007 au site PB, malgré un poids du foie significativement plus élevé à ce site, pourrait être expliqué par de plus fortes concentrations en fertilisants (nitrates, nitrites et phosphore) que dans les autres sites (Spear *et al.*, 2009). La présence des fertilisants, comme les oxydes nitriques, suffit à induire la synthèse des *CYP* dans le foie pour inactiver les substances toxiques et ainsi expliquer l'augmentation du poids du foie. Toutefois, l'action de ces *CYP* pourrait aussi être inhibée par ces mêmes substances.

En effet, il semble que les formes oxydées des nitrites et nitrates possèdent une grande affinité pour l'hème ferrique présente au cœur des enzymes du *CYP450*. En s'y liant, les oxydes nitriques provoqueraient l'inhibition de l'activité de ces enzymes (Henry *et al.*, 1991; Khatsenko et Kikkawa, 1997).

Notre étude montre que l'oxydation de l'AR semble moins efficace chez les femelles que chez les mâles, probablement dû au fait que l'échantillonnage a eu lieu durant la période de reproduction et que le métabolisme général des femelles est fortement sollicité pour la maturation des œufs. Dans l'ensemble, la croissance des animaux semble être altérée dans les sites les plus contaminés, ce qui rejoint les résultats antérieurs concernant les mêmes populations de grenouilles. Aussi, autant chez les mâles que chez les femelles, l'activité catabolique tend à augmenter avec l'exposition aux contaminants agricoles, situation qui, à plus ou moins long terme, pourrait nuire à la santé des ouaouarons du secteur de la Yamaska.

2.6 REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier Marjolaine Bisson pour l'aide technique ainsi que Philip Spear pour son aide dans la mise au point du protocole de HPLC. Des remerciements doivent être attribués aux collaborateurs du Projet Ouaouaron TOXEN-CIRÉ pour la capture des animaux et l'obtention des tissus et des données morphométriques.

Cette étude a été supportée financièrement par une bourse d'excellence de l'UQAM pour les cycles supérieurs (Fonds à l'accessibilité et à la réussite des études - FARE), accordée à J. Thibodeau ainsi qu'une subvention À la découverte, du Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie (CRSNG), octroyée à M. Boily.

2.7 RÉFÉRENCES

- Ankley, G. T., S. J. Degitz, S. A. Diamond et J. E. Tietge. 2004. «Assessment of Environment stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians». *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Vol. 58, no 1, p. 7-16.
- Arcand-Hoy, L. D., et C. D. Metcalfe. 1999. «Biomarkers of exposure of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) to contaminants in the lower Great Lakes, North America». *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 18, no 4, p. 740-749.
- Armstrong, J. L., C. P. F. Redfern et G. J. Veal. 2005. «13-cis Retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology - Is changing shape the key to success?». *Biochem. Pharmacol.* Vol. 69, no 9, p. 1299-1306.
- Bérubé, V. E., M. H. Boily, C. DeBlois, N. Dassylva et P. A. Spear. 2005. «Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada». *Aquat. Toxicol.* Vol. 71, no 2, p. 109-120.
- Blumberg, B., D. J. Mangelsdorf, J. A. Dyck, D. A. Bittner, R. M. Evans et E. M. De Robertis. 1992. «Multiple retinoid-responsive receptors in a single cell: Families of retinoid 'X' receptors and retinoic acid receptors in the *Xenopus* egg». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 89, no 6, p. 2321-2325.
- Boily, M. H., V. E. Bérubé, P. A. Spear, C. DeBlois et N. Dassylva. 2005. «Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides». *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 24, no 5, p. 1099-1106.
- Boily, M. H., A. Ndayibagira et P. A. Spear. 2003. «Retinoids, LRAT and REH activities in eggs of Japanese quail following maternal and in ovo exposures to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl». *Ecotoxicol.* Vol. 12, no 1-4, p. 9-21.
- Boily, M., J. Thibodeau et M. Bisson. 2009. «Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination». *Aquat. Toxicol.* Vol. 91, no 2, p. 118-125.
- Boyer, P. M., A. Ndayibagira et P. A. Spear. 2000. «Dose-dependent stimulation of hepatic retinoic acid hydroxylation/oxidation and glucuronidation in brook trout, *Salvelinus fontinalis*, after exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl». *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 19, no 3, p. 700-705.
- Bradford, M. M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding». *Anal. Biochem.* Vol. 72, no 1-2, p. 248-254.
- Casabar, R. C. T., A. D. Wallace, E. Hodgson et R. L. Rose. 2006. «Metabolism of endosulfan- α by human liver microsomes and its utility as a simultaneous in vitro probe for CYP2B6 and CYP3A4». *Drug Metab. Dispos.* Vol. 34, no 10, p. 1779-1785.
- Champoux, L., J. Rodrigue, S. Trudeau, M. H. Boily, P. A. Spear et A. Hontela. 2006. «Contamination and biomarkers in the great blue heron, an indicator of the state of the St. Lawrence River». *Ecotoxicol.* Vol. 15, no 1, p. 83-96.

- Daniels, E., et P. Licht. 1980. «Effects of gonadotropin-releasing hormone on the levels of plasma gonadotropins (FSH and LH) in the bullfrog, *Rana catesbeiana*». *Gen. Comp. Endocrinol.* Vol. 42, no 4, p. 455-463.
- Doyon, C., R. Fortin et P. A. Spear. 1999. «Retinoic acid hydroxylation and teratogenesis in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence river and Abitibi region Quebec». *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 56, no 8, p. 1428-1436.
- Duester, G. 2008. «Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis». *Cell.* Vol. 134, no 6, p. 921-931.
- Eichele, G. 1989. «Retinoids and vertebrate limb pattern formation». *Trends Genet.* Vol. 5, no 8, p. 246-251.
- Gilbert, N. L., M. J. Cloutier et P. A. Spear. 1995. «Retinoic acid hydroxylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the effect of a coplanar PCB, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl». *Aquat. Toxicol.* Vol. 32, no 2-3, p. 177-187.
- Giroux, I., 2010. Présence de pesticides dans l'eau au Québec – Bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2005, 2006 et 2007 et dans des réseaux de distribution d'eau potable, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 78 p.
- Gorse, I., et S. Dion (2009). Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2006. Ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parcs. Québec: 83 p.
- Groppelli, S., R. Pennati, F. De Bernardi, E. Menegola, E. Giavini et C. Sotgia. 2005. «Teratogenic effects of two antifungal triazoles, triadimefon and triadimenol, on *Xenopus laevis* development: Craniofacial defects». *Aquat. Toxicol.* Vol. 73, no 4, p. 370-781.
- Henry, Y., C. Ducrocq, J. C. Drapier, D. Servent, C. Pellat et A. Guissani. 1991. «Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells». *Eur. Biophys. J.* Vol. 20, no 1, p.1-15.
- Hervé, J. C., D. Crump, S. P. Jones, L. J. Mundy, J. P. Giesy, M. J. Zwiernik, S. J. Bursian, P. D. Jones, S. B. Wiseman, Y. Wan et S. W. Kennedy. 2010. «Cytochrome P4501A Induction by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin and Two Chlorinated Dibenzofurans in Primary Hepatocyte Cultures of Three Avian Species». *Toxicol. Sci.* Vol. 113, no 2, p. 380-391.
- Hoffmann, C., et G. Eichele. 1994. «Retinoids in development». Dans *The Retinoids: Biol., Chem., and Medicine*, M. B. Sporn, A. B. Roberts et D.S. Goodman, New York: Second ed. Raven Press, p. 387-441.
- Hollemann, T., Y. Chen, H. Grunz et T. Pieler. 1998. «Regionalized metabolic activity establishes boundaries of retinoic acid signalling». *EMBO J.* Vol. 17, no 24, p. 7361-7372.

- Hyman, L. E., et W. M. Wormington. 1988. «Translational inactivation of ribosomal protein mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation». *Genes Dev.* Vol. 2, no 5, p. 598-605.
- Idres, N., J. Marill, M. A. Flexor et G. G. Chabot. 2002. «Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers». *J. Biol. Chem.* Vol. 277, no 35, p. 31491-31498.
- Johnson, C. S., R. M. Zucker, E. S. Hunter Iii et K. K. Sulik. 2007. «Perturbation of retinoic acid (RA)-mediated limb development suggests a role for diminished RA signaling in the teratogenesis of ethanol». *Birth Defects Res. Part A – Clin. Mol. Teratol.* Vol. 79, no 9, p. 631-641.
- Khatsenko, O., et Y. Kikkawa. 1997. «Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome p450 isoforms in rat liver». *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Vol. 280, no 3, p. 1463-1470.
- Kuzyk, Z. Z. A., N. M. Burgess, J. P. Stow et G. A. Fox. 2003. «Biological effects of marine PCB contamination on black guillemot nestlings at Saglek, Labrador: Liver biomarkers». *Ecotoxicol.* Vol. 12, no 1-4, p. 183-197.
- Lannoo, M. J., D. R. Sutherland, P. Jones, D. Rosenberry, R. W. Klaver, D. M. Hoppe, P. T. J. Johnson, K. B. Lunde, C. Facemire et J. M. Kapfer. 2003. «Multiple causes for the malformed frog phenomenon». Dans *Multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations*, G. Linder, E. Little, S. Krest et D. Sparling, p. 233-262. Pennsylvania: ASTM Special Technical Publication 1443.
- Leiva-Presa, A., A. S. Mortensen, A. Arukwe et B. M. Jenssen. 2006. «Altered hepatic retinol and CYP26 levels in adult European common frogs (*Rana temporaria*) exposed to p,p'-DDE». *Marine Environ. Res.* Vol. 62, no SUPPL. 1, p. S10-S15.
- Lemaire, G., G. De Sousa et R. Rahmani. 2004. «A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides». *Biochem. Pharmacol.* Vol. 68, no 12, p. 2347-2358.
- Lemaire, G., P. Balaguer, S. Michel et R. Rahmani. 2005. «Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides». *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 202, no 1, p. 38-49.
- Li, H. C., et D. Kupfer. 1998. «Mechanism of Induction of Rat Hepatic CYP2B and 3A by the Pesticide Methoxychlor». *J. Biochem. Mol. Toxicol.* Vol. 12, no 6, p. 315-323.
- Mazurais, D., N. Glynatsi, M. J. Darias, S. Christodouloupoulou, C. L. Cahu, J. L. Zambonino-Infante et G. Koumoundouros. 2009. «Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type». *Aquacult.* Vol. 294, no 3-4, p. 262-270.

- McCreery, B. R., et P. Licht. 1983. «Induced ovulation and changes in pituitary responsiveness to continuous infusion of gonadotropin-releasing hormone during the ovarian cycle in the bullfrog, *Rana catesbeiana*». *Biol. Reprod.* Vol. 29, no 4, p. 863-871.
- McKenzie, R. M., D. M. Hellwege, M. L. McGregor et E. C. Nelson. 1979. «Oxidation and isomerization of retinoic acid by iodine and light: A novel preparation of all-trans- and 13-cis-4-oxoretinoic acid». *Lipids.* Vol. 14, no 8, p. 714-717.
- McSorley, L. C., et A. K. Daly. 2000. «Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-trans-retinoic acid 4-hydroxylation». *Biochem. Pharmacol.* Vol. 60, no 4, p. 517-526.
- Menegola, E., M. L. Broccia, F. Di Renzo et E. Giavini. 2006. «Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects». *Reprod. Toxicol.* Vol. 22, no 2, p. 186-195.
- Meteyer, C. U., I. Kati Loeffler, J. F. Fallon, K. A. Converse, E. Green, J. C. Helgen, S. Kersten, R. Levey, L. Eaton-Poole et J. G. Burkhardt. 2000. «Hind limb malformations in free-living northern leopard frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies». *Teratol.* Vol. 62, no 3, p. 151-171.
- Murk, A. J., P. E. G. Leonards, B. Van Hattum, R. Luit, M. E. J. Van Der Weiden et M. Smit. 1998. «Application of biomarkers for exposure and effect of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in naturally exposed European otters (*Lutra lutra*)». *Environ. Toxicol. Pharmacol.* Vol. 6, no 2, p. 91-102.
- Ouellet, M., J. Bonin, J. Rodrigue, J. L. DesGranges et S. Lair. 1997. «Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats». *J. Wildl. Dis.* Vol. 33, no 1, p. 95-104.
- Papis, E., G. Bernardini, R. Gornati et M. Prati. 2006. «Triadimefon causes branchial arch malformations in *Xenopus laevis* embryos». *Environ. Sci. Poll. Res.* Vol. 13, no 4, p. 251-255.
- Pijnappel, W. W. M., H. F. J. Hendriks, G. E. Folkers, C. E. Van Den Brink, E. J. Dekker, C. Edelenbosch, P. T. Van Der Saag et A. J. Durston. 1993. «The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is highly active modulator of positional specification». *Nature.* Vol. 366, no 6453, p. 340-344.
- Ramp, U., C. D. Gerharz, E. Eifler, H. K. Biesalski et H. E. Gabbert. 1994. «Effects of retinoic acid metabolites on proliferation and differentiation of the clonal rhabdomyosarcoma cell line BA-HAN-1C». *Biol. Cell.* Vol. 81, no 1, p. 31-37.
- Ray, W. J., G. Bain, M. Yao et D. I. Gottlieb. 1997. «CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family». *J. Biol. Chem.* Vol. 272, no 30, p. 18702-18708.
- Satre, M. A., et D. M. Kochhar. 1989. «Elevations in the endogenous levels of the putative morphogen retinoic acid in embryonic mouse limb-buds associated with limb dysmorphogenesis». *Develop. Biol.* Vol. 133, no 2, p. 529-536.

- Schoff, P. K., C. M. Johnson, A. M. Schotthoefer, J. E. Murphy, C. Lieske, R. A. Cole, L. B. Johnson et V. R. Beasley. 2003. «Prevalence of skeletal and eye malformations in frogs from North-Central United States: Estimations based on collections from randomly selected sites». *J. Wildl. Dis.* Vol. 39, no 3, p. 510-521.
- Schultz, R. M., et P. M. Wassarman. 1977. «Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse». *J. Cell Sci.* Vol. 24, p. 167-194.
- Solari, M, J. Paquin, P Ducharme et M. Boily. 2010. «P19 neuronal differentiation and retinoic acid metabolism as criteria to investigate atrazine, nitrite and nitrate». *Toxicol. Sci.* Vol. 113, no 1, p. 116-126.
- Spear, P. A., M. Boily, I. Giroux, C. DeBlois, M. H. Leclair, M. Levasseur et R. Leclair. 2009. «Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada». *Aquat. Toxicol.* Vol. 91, no 2, p. 110-117.
- Sulik, K. K., et D. B. Dehart. 1988. «Retinoic-acid-induced limb malformations resulting from apical ectodermal ridge cell death». *Teratol.* Vol. 37, no 6, p. 527-537.
- Tannahill, D., et D. A. Melton. 1989. «Localized synthesis of the Vgl protein during early *Xenopus* development». *Develop.* Vol. 106, no 4, p. 775-785.
- White, J. A., Y. D. Guo, K. Baetz, B. Beckett-Jones, J. Bonasoro, K. E. Hsu, F. Jeffrey Dilworth, G. Jones et M. Petkovich. 1996. «Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4- hydroxylase». *J. Biol. Chem.* Vol. 271, no 47, p. 29922-29927.
- White, R. J., Q. Nie, A. D. Lander et T. F. Schilling. 2007. «Complex regulation of cyp26a1 creates a robust retinoic acid gradient in the zebrafish embryo». *PLoS Biol.* Vol. 5, no 11, p. 2522-2533.
- Yashiro, K., X. Zhao, M. Uehara, K. Yamashita, M. Nishijima, J. Nishino, Y. Saijoh, Y. Sakai et H. Hamada. 2004. «Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb». *Develop. Cell.* Vol. 6, no 3, p. 411-422.
- Zhao, X., I. O. Sirbu, F. A. Mic, N. Molotkova, A. Molotkov, S. Kumar et G. Duester. 2009. «Retinoic Acid Promotes Limb Induction through Effects on Body Axis Extension but Is Unnecessary for Limb Patterning». *Curr. Biol.* Vol. 19, no 12, p. 1050-1057.

Tableau 2.I. Longueur museau-cloaque (cm) mesurée sur les ouaouarons échantillonnés dans le bassin de la rivière Yamaska en 2007 et 2008.

Sites	2007	2008
LB	12,68±0,59 ^b	13,63±0,77 ^a
DS	12,09±1,53 ^b	12,79±1,03 ^{ab}
PB	14,17±1,72 ^a	13,00±1,00 ^{ab}
FA	12,90±1,17 ^b	13,17±1,34 ^{ab}
CH	12,66±0,95 ^b	11,69 ±0,52 ^c
RN	11,91±1,24 ^b	12,50±1,97 ^{cb}

Les moyennes ont été comparées au moyen d'une analyse de variance à un critère de classification (ANOVA) suivi d'un test de comparaison multiple (Tukey), $p < 0,05$. Pour une même année, les sites possédant des lettres différentes sont considérés statistiquement différents.

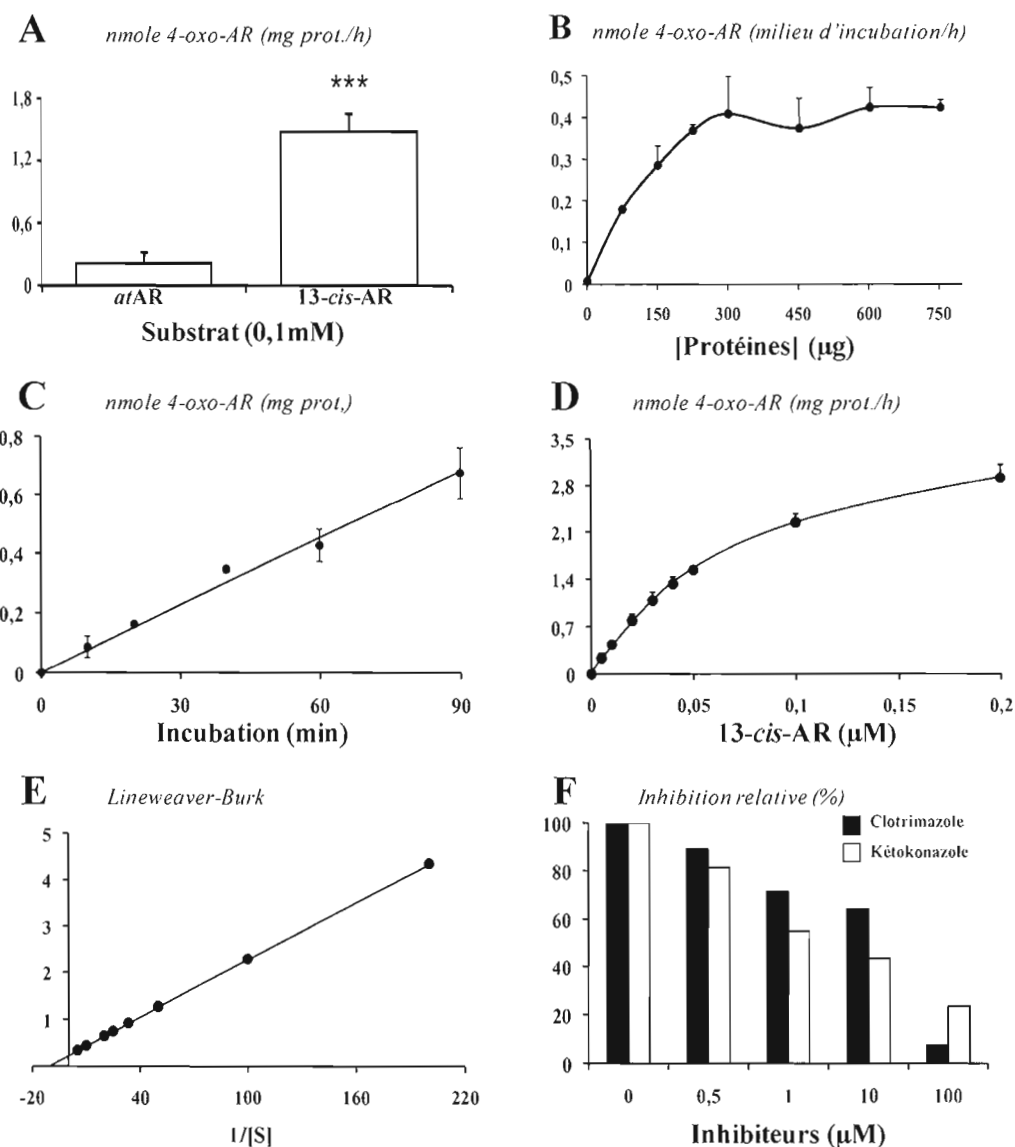


Figure 2.1. Mesure de l'activité d'oxydation de l'AR dans les microsomes hépatiques de ouaouarons échantillonnés dans la rivière Yamaska. A) Effet de deux substrats sur l'activité enzymatique. B) Concentration de protéines. C) Temps d'incubation. Paramètres cinétiques: D) Effet de la concentration du 13-cis-AR sur l'activité; E) Transformation Lineweaver-Burk. F) Effet de deux inhibiteurs sur l'activité enzymatique.

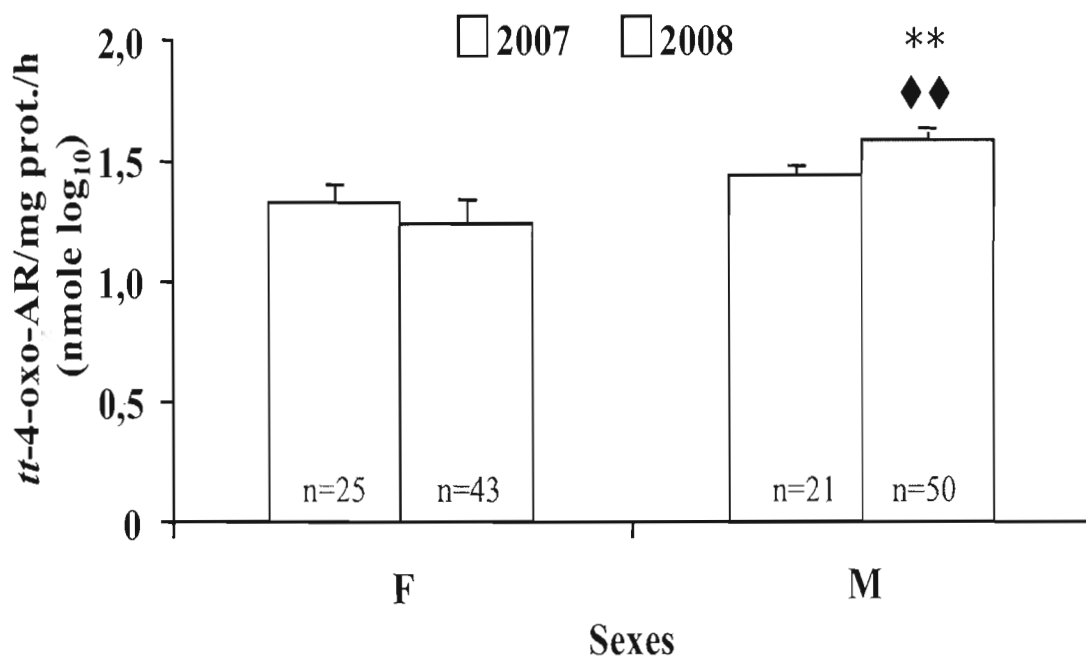


Figure 2.2. Catabolisme de l'AR testé à partir de microsomes hépatiques des ouaouarons mâles et femelles, échantillonnés dans le bassin de la rivière Yamaska en 2007 et 2008; comparaison entre sexes. Chaque histogramme représente la moyenne et l'écart-type du nombre d'individus indiqué. Les moyennes ont été comparées avec un test *t* de Student, assumant une variance inégale. Les astérisques représentent la comparaison entre mâles et femelles, alors que les losanges noirs sont pour la comparaison entre les années 2007 et 2008. ** = $p < 0,01$; ◆◆ = $p < 0,01$.

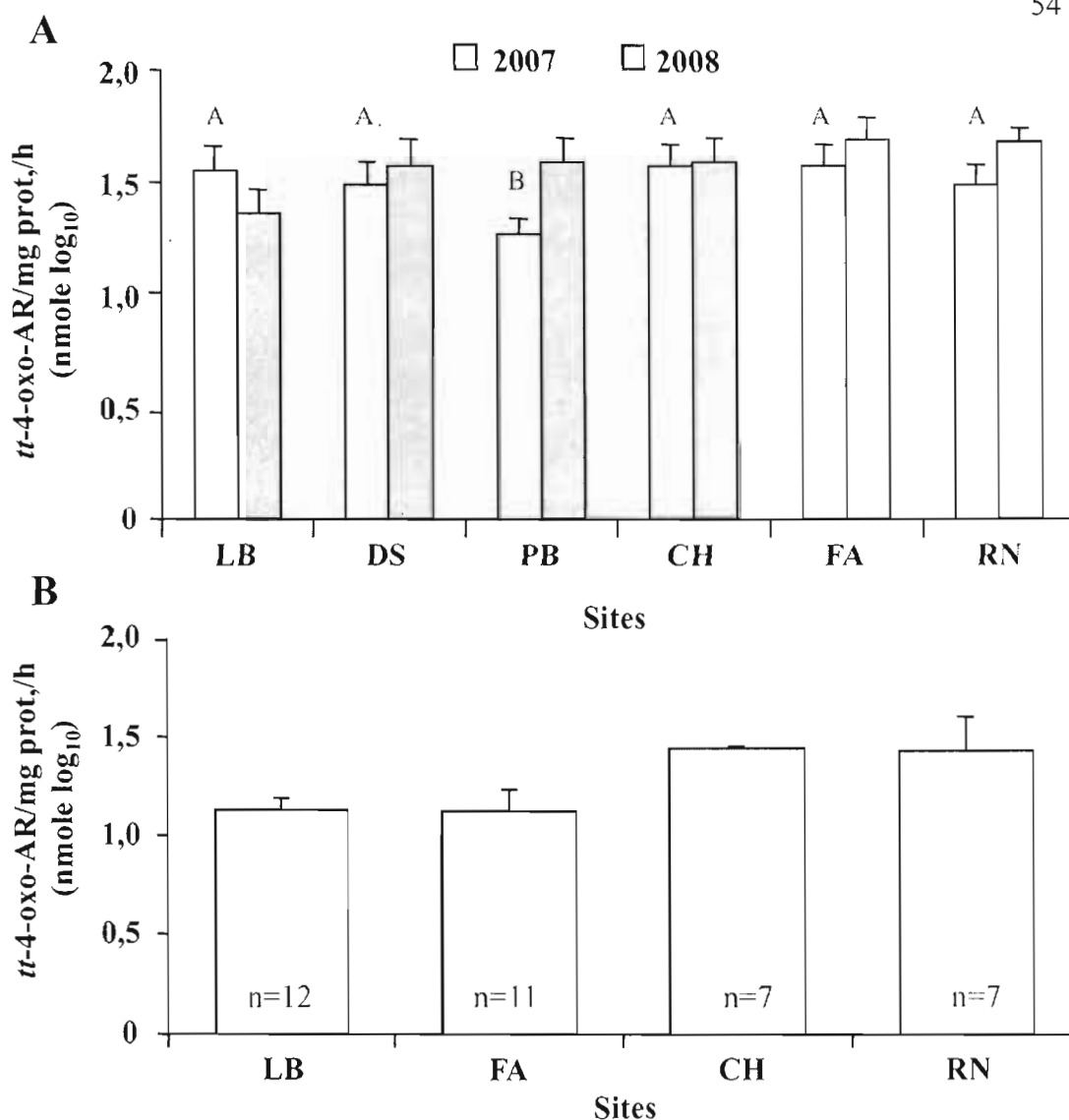


Figure 2.3. Catabolisme de l'AR testé à partir de microsomes hépatiques des ouaouarons mâles et femelles, échantillonnés dans le bassin de la rivière Yamaska en 2007 et 2008; comparaison entre sites. Chaque histogramme représente la moyenne et l'écart type de 5 à 11 individus. Les moyennes ont été comparées au moyen d'une analyse de variance à un critère de classification (ANOVA), suivi d'un test de comparaisons multiples (Tukey). Les sites qui partagent les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents. B) Femelles. Chaque histogramme représente la moyenne et l'écart type du nombre d'individus indiqué. Les moyennes ont été comparées avec un test *t* de Student, assumant une variance inégale. Les sites DB et PB ont été exclus des analyses statistiques, faute d'un nombre insuffisant de femelles matures (voir Matériel et méthodes).

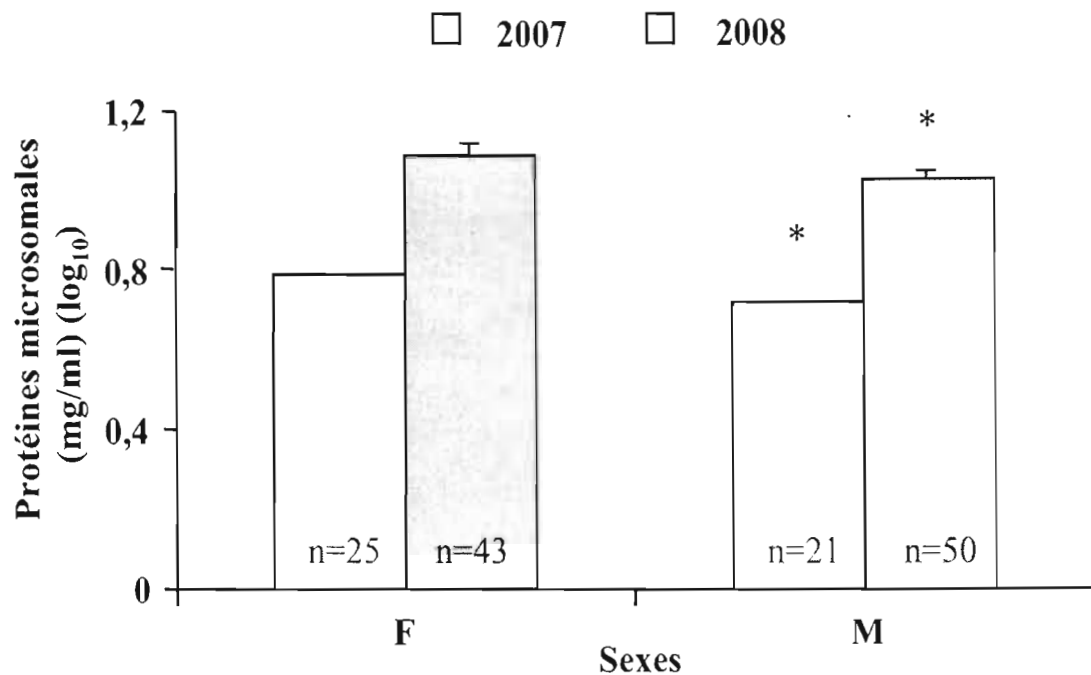


Figure 2.4. Protéines mesurées dans les microsomes hépatiques des ouaouarons échantillonnés dans le bassin de la rivière Yamaska en 2007 et 2008. Chaque histogramme représente la moyenne et l'écart type du nombre d'individus indiqué. Les moyennes ont été comparées au moyen d'un test «*t*» de Student, à variances inégales. Les astérisques représentent la comparaison entre mâles et femelles. * = $p < 0,05$.

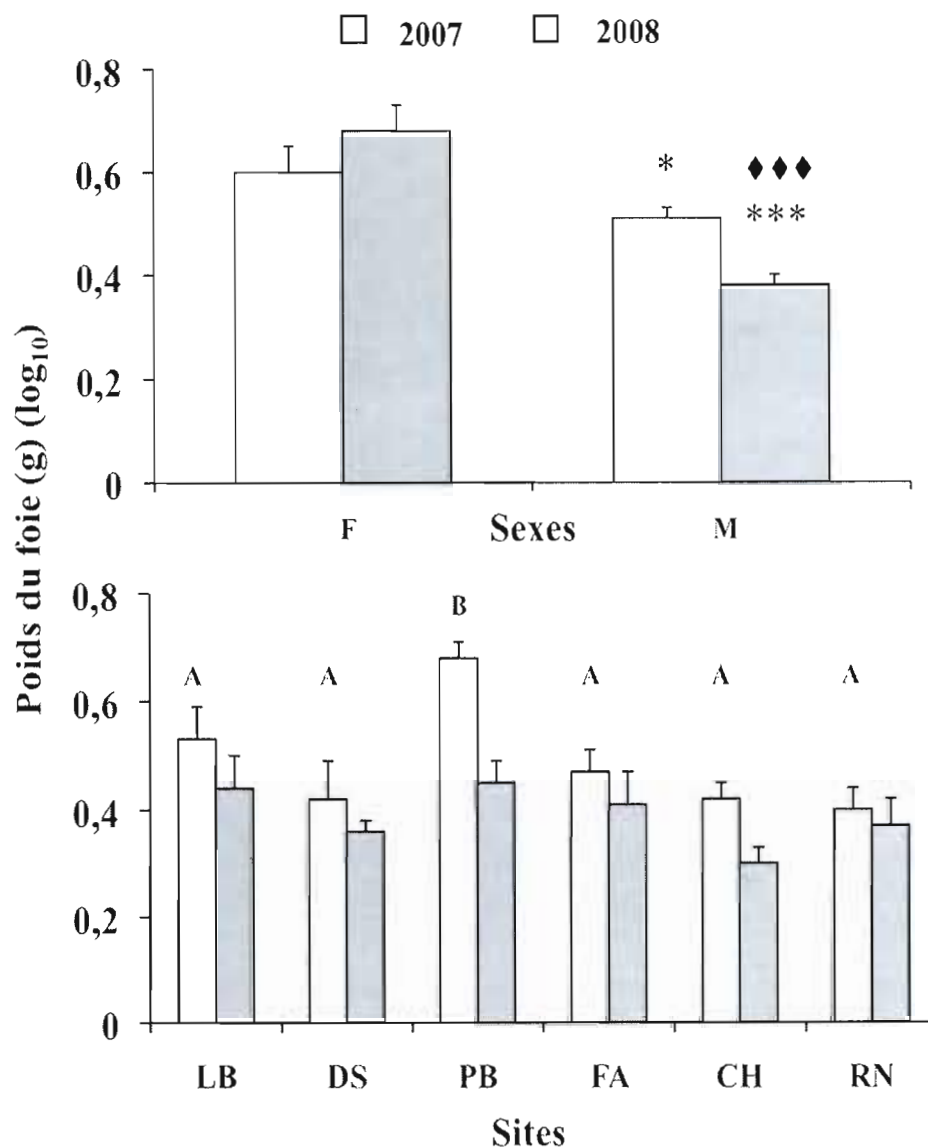


Figure 2.5. Poids du foie des ouaouarons mâles et femelles échantillonnés dans le bassin de la rivière Yamaska en 2007 et 2008. A) Chaque histogramme représente la moyenne et l'écart type du nombre d'individus indiqué. Les moyennes ont été comparées au moyen d'un test «*t*» de Student, à variances inégales. Les astérisques représentent la comparaison entre mâles et femelles. * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$; ♦♦♦ = $p < 0,001$. B) Poids du foie des mâles en 2007 et 2008. Chaque histogramme représente la moyenne et l'écart type de 5 à 11 individus. Les moyennes ont été comparées par un test de variance à un critère de classification (ANOVA), suivi d'un test de comparaisons multiples (Tukey), $p < 0,05$.

CHAPITRE III

EXPLORATION DU CATABOLISME DE L'AR SUR LE MODÈLE CELLULAIRE P19.

3.1 MISE EN CONTEXTE.

Bien que des recherches *in vivo* sur la perturbation des rétinoides endogènes chez les ouaouarons de la rivière Yamaska aient été entreprises, on n'a, en somme, que très peu d'informations sur les mécanismes cellulaires impliqués dans les malformations des membres. Un des aspects du projet visait d'ailleurs à mettre au point un bioessai cellulaire permettant de juger du potentiel tératogène de différents contaminants d'origine agricole et de leurs mécanismes cellulaires potentiels. Dans cette optique, le présent travail se veut une étude exploratoire du catabolisme de l'AR sur un modèle cellulaire. Comme il n'existe pas de lignée cellulaire embryonnaire issue des amphibiens, la lignée cellulaire P19 de carcinome embryonnaire de souris a été sélectionnée comme matériel biologique pour cette étude. Ce modèle apparaît tout à fait pertinent étant donné que ces cellules répondent de façon naturelle et reproductible à l'AR.

Le métabolisme de l'AR dans les cellules P19 (homogénat et microsomes) a été partiellement établi (Sonneveld *et al.*, 1999). En moins de 4 à 6 heures, le métabolisme de l'AR est déjà bien entamé et ce taux de métabolisation peut être fortement suractivé suite à un prétraitement avec le substrat AR. Cinq métabolites sont formés, le 4-hydroxy-AR, en majorité, ainsi que le 18-hydroxy-AR et le 4-oxo-AR. Une récente étude a aussi mis en évidence la réaction d'oxydation de l'AR dans les cellules P19 lors du processus de différenciation neuronale (Solari *et al.*, 2010).

Les cellules F9 de type EC (*Embryonal Carcinoma*) représentent un autre modèle cellulaire capable de métaboliser aisément l'AR et ce métabolisme a déjà été établi (Williams et Napoli, 1985). Le métabolisme oxydatif de l'AR par les cellules de type EC semble être bien conservé au cours de l'évolution des groupes taxonomiques.

La présente étude vise donc à reproduire et optimiser la réaction d'oxydation de l'AR sur le modèle cellulaire P19, dans l'objectif d'en faire ultérieurement un bioessai qui servira à juger du potentiel tératogène de différents types de contaminants. Ainsi, l'étude des mécanismes cellulaires sous-jacents aux malformations associées à une perturbation des concentrations cellulaires d'AR deviendra plus aisée à étudier.

3.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.

3.2.1 Culture cellulaire.

Les cellules P19 sont maintenues en culture monocouche dans un milieu MCP19 fait de Milieu Essentiel Minimum de Eagle, avec modification alpha (a-MEM, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada), supplémenté de sérum bovin fœtal (FBS 10%: PAA Laboratories Inc., Toronto, Ontario, Canada) et d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine 0,5%: Invitrogen). Les cellules sont incubées à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂ (adapté de McBurney *et al.*, 1982). Les cultures confluentes sont dissociées suite à une incubation en présence d'une solution tampon de phosphate (PBS) contenant 0,025% (p/v) de trypsine (Sigma-Aldrich) et 1mM de EDTA. À tous les 48h, les cellules sont remises en culture dans un milieu complet à raison de 1×10^6 cellules/10mL de milieu.

3.2.2 Prétraitement avec *tt*-AR.

Le prétraitement à l'AR a été effectué selon le protocole de Sonneveld *et al.*, (1998), avec quelques ajustements. Huit heures avant la récolte des cultures confluentes, 10 μ L d'une solution-mère de *tt*-AR (1mM dans MCP19) sont ajoutés au pétri. Les cultures confluentes sont décollées au moyen d'une pipette avec du PBS, collectées par centrifugation et congelées sans milieu à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3.2.3 Microsomes cellulaires.

Pour obtenir la fraction microsomale cellulaire, les culots cellulaires provenant de 10 pétris confluentes sont préalablement décongelés sur glace, puis combinés. Les cellules sont resuspendues dans environ 0,5 mL de tampon potassium phosphate 10mM (pH 7.4) contenant 0,25 M de sucrose et 1 mM de EDTA. La suspension passe ensuite au bain ultra-sons à cinq reprises pendant 8 secondes. Un tampon potassium phosphate est ajouté (2,5mL) et le mélange est soumis à une première centrifugation: 15 minutes à 12 000 x g. Le surnageant subit une seconde ultracentrifugation: 60 minutes à 100 000 x g et le culot résultant, contenant la fraction microsomale, est resuspendu dans 600 μ L de 50mM de tampon potassium phosphate (pH 7.4) contenant 20% (v/v) de glycérol et 1mM de EDTA avant d'être plongé dans l'azote liquide puis transféré dans un congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation. Toutes les étapes d'extraction des microsomes sont effectuées à 4°C. Le dosage protéique a été réalisé selon la méthode de Bradford, (1976).

3.2.4 Essais enzymatiques et extraction des métabolites.

Les essais enzymatiques sont effectués selon le protocole légèrement adapté de Han et Choi (1996). Les microsomes cellulaires prétraités avec 1 μ M de *11*-AR sont décongelés sur glace avant le début des analyses.

La réaction enzymatique est initiée avec l'ajout de 100 μ L de la suspension microsomale (environ 300 μ g de protéine enzymatique selon le dosage protéique) au milieu réactionnel préalablement incubé à 37°C: 0,1M Tris-HCl (pH 7.4), 20mM tampon sodium phosphate (pH 7.0), 5mM MgCl₂, 0,15M KCl, 10% glycérol, 1,5mM NADPH et environ 80nM *11*-AR, dans un volume total de 600 μ L. Le mélange réactionnel est incubé pendant 60 minutes à 37°C avec un brassage continu. La réaction est arrêtée sur glace par l'ajout du mélange d'extraction, 600 μ L dichlorométhane: méthanol (2:1). Suite à un vortex de 30 secondes, les solutions sont centrifugées à 7 000 x g pendant 5 minutes. La phase organique inférieure est transférée dans un tube et évaporée durant 5 minutes, 45°C à l'évaporateur rotatif. Les rétinoïdes sont conservés sous azote gazeux à -20°C jusqu'à leur dosage. Toutes les étapes sont effectuées sous lumière jaune pour éviter l'isomérisation des rétinoïdes.

3.2.5 Dosage des rétinoïdes.

Le dosage du métabolite *11*-4-oxo-AR est effectué en chromatographie liquide en phase inverse. Les rétinoïdes sont resuspendus dans 100 μ L d'acétonitrile et amenés à température pièce et 80 μ l ont été injectés dans le système HPLC. La méthode de séparation et de quantification des rétinoïdes est la même que celle utilisée pour le l'oxydation de l'AR dans les microsomes hépatiques de ouaouarons (Chapitre II). Toutes les étapes du dosage des rétinoïdes sont effectuées sous lumière jaune.

3.3 CONCLUSIONS RELATIVES AUX EXPÉRIMENTATIONS.

Bien que la réaction d'oxydation de l'AR par les cellules P19 ait été partiellement caractérisée dans les études de Sonneveld *et al.*, (1999), un tel catabolisme n'a pu être reproduit dans notre laboratoire avec succès. En effet, les métabolites produits suite aux essais enzymatiques étaient en très faibles quantités et la reproductibilité des résultats presque nulle. En lieu et place des résultats non concluants des analyses, la discussion qui suit traitera des avenues empruntées pour tenter, en vain, l'obtention d'une réaction stable donnant lieu à la formation d'une quantité raisonnable et quantifiable de *tt*-4-oxo-AR, ainsi que des suggestions pour de futures tentatives.

Le protocole utilisé pour le catabolisme de l'AR chez les cellules P19 est celui publié par Sonneveld *et al.*, (1998) pour des cellules T-47D de cancer du sein, légèrement modifié de celui de Han et Choi, (1996), méthode appliquée par la suite avec succès pour des cellules P19 par le même laboratoire (Sonneveld *et al.*, 1999). Des essais ont d'abord été tentés sans induction des *CYP450* par prétraitement au substrat AR, mais aucun métabolite n'a pu être dosé. Lorsque les cultures étaient pré-exposées à 1 μ M de *tt*-AR sur une période de 8hrs, une très faible réponse enzymatique a pu être quantifiée au HPLC. Toutefois, la reproductibilité des résultats étant pratiquement nulle, le protocole a dû être entièrement revu.

La culture cellulaire.

Les conditions entourant la culture cellulaire des cellules P19 sont bien établies depuis déjà plusieurs années (McBurney *et al.*, 1982) et ont été récemment utilisées avec succès par Solari *et al.*, (2010). De façon générale, le passage des cellules donnait lieu à un tapis cellulaire confluent (85-100%) après 48hrs d'incubation. Pour éviter l'apparition de mutations dans le génome cellulaire, de nouvelles cultures fraîches étaient utilisées à chaque 30 jours. En ce qui concerne le protocole de culture cellulaire, aucun changement n'a été apporté aux conditions proposées puisqu'aucun problème n'a été noté à ce niveau.

Microsomes cellulaires.

La méthode utilisée pour l'extraction des microsomes, à partir des culots de cellules, est celle proposée par Sonneveld *et al.*, (1998; 1999) qui propose la sonication pour détruire les membranes cellulaires. La quantité de cellules nécessaire à l'obtention d'une suspension microsomale à une concentration protéique raisonnable pour les essais enzymatiques était très grande. Cela suggère que la méthode de préparation des microsomes donne un rendement insuffisant. Un broyeur de type « Potter » a donc été testé pour comparer le rendement protéique des méthodes. Il s'est toutefois avéré que le protocole de base était plus efficace que le second malgré de très faibles résultats.

*Prétraitement de 8hrs à 1 μ M de *tt*-AR.*

Comme suggéré par le protocole de base pour stimuler le catabolisme, les cultures cellulaires ont ensuite été préincubées en présence du substrat de façon à induire la production des protéines enzymatiques *CYP450*. Lors des expérimentations faites par Sonneveld *et al.*, (1998; 1999), des périodes de prétraitement variant de 1 à 24 hrs précédant la récolte des cellules ont été testées. Les analyses en « Northern blot » ont permis de montrer que l'expression des ARNm des *CYP450* était induite après 2hrs et significativement plus forte après 4hrs, induction stable jusqu'à 24hrs de prétraitement. Pour s'assurer une importante induction enzymatique, dans l'optique d'obtenir des quantités raisonnables de métabolites lors des essais, une pré-incubation de 8hrs a été sélectionnée. Après plusieurs tentatives, une diminution dans la confluence (60-80%) des cultures après 48hrs a été remarquée. La présence de *tt*-AR dans le milieu de culture semblait perturber la croissance et la multiplication des cellules. Les culots cellulaires ont tout de même été recueillis pour les analyses enzymatiques.

Essais enzymatiques et dosage au HPLC.

Le protocole pour les essais enzymatiques a été suivi à la lettre dans un premier temps. N'obtenant que des résultats douteux, les concentrations de protéines microsomales et de substrat ainsi que le temps d'incubation ont été investigués. Selon les mêmes études que citées précédemment, une réponse enzymatique quantifiable était obtenue en présence de 100µg et 200µg de protéine microsomale incubées durant 30 à 45min en présence du substrat en excès (10nM *11*-AR). Des concentrations de microsomes variant de 100µg à 600µg de protéines, des concentrations de *11*-AR variant de 1nM à 100nM ainsi que des temps d'incubation entre 15 et 60min ont été testées sans succès dans notre laboratoire. La pureté du substrat a été régulièrement vérifiée. Des doutes sont donc apparus en ce qui concerne la méthode d'extraction des rétinoïdes sur le mélange réactionnel. La méthode proposée utilisait le dichlorométhane: méthanol (2:1) qui générait un bon rendement. Différentes méthodes d'extraction ont été tentées et comparées. L'extraction au dichlorométhane: méthanol (2:1) s'est avérée la plus efficace pour le métabolite *at*-4-oxo-AR (essais avec: acétate d'éthyle + 1% acide acétique, acétate d'éthyle: hexane + 0,068% acide acétique (1:1), chloroforme: méthanol (2: 1), chloroforme: acétonitrile (2: 1)). Enfin, la méthode d'élution des rétinoïdes au HPLC, bien que différente de celle proposée par Sonneveld *et al.*, (1998; 1999), a été validée dans plusieurs publications antérieures et n'a donc pas été modifiée (Boyer *et al.*, 2000; Doyon *et al.*, 1999; Gilbert *et al.*, 1995; Leo *et al.*, 1984). Malgré tout, les quantités de métabolites dosées au HPLC étaient toujours très faibles.

Perspectives à vérifier pour de futures tentatives.

L'optimisation d'un bioessai cellulaire pour l'étude du catabolisme de l'AR étant un projet parallèle à celui de l'oxydation de l'AR chez le ouaouaron de la rivière Yamaska, les efforts dans ce sens ont dû être ralentis. Toutefois, après une longue période de réflexion et de lecture, certaines options se sont révélées. Dans l'optique du laboratoire à retenter l'expérience, quelques avenues devraient être explorées.

Dans un premier temps, puisque le prétraitement des cultures cellulaires à $1\mu\text{M}$ d'AR semblait affecter la prolifération normale des cellules, il y aurait peut-être lieu de tester différents temps d'exposition. Dans le protocole d'origine on notait une induction significative du catabolisme de l'AR après seulement 4hrs de prétraitement. En diminuant le temps d'exposition des cellules à la molécule active qu'est l'AR, peut-être obtiendra-t-on une confluence à 48hrs plus près de ce qu'on obtenait sans prétraitement. Malgré le faible pourcentage de confluence des cellules prétraitées, les culots cellulaires ont tout de même été récoltés et utilisés pour les analyses enzymatiques. La perturbation de la prolifération des cultures prétraitées pourrait aussi avoir eu un impact sur le métabolisme général et la viabilité des cellules. Un certain pourcentage de mortalité chez les cellules récoltées pourrait aussi expliquer le faible catabolisme de l'AR durant les essais. La source la plus plausible d'erreur est sans doute la méthode d'extraction des microsomes. Une quantité énorme de culot cellulaire donnait un rendement de protéines microsomaux très faible. Pourtant, dans le protocole de départ, rien ne laissait suggérer une telle demande en matériel cellulaire. La mise au point de la fabrication des microsomes devrait être envisagée. Dans cette optique, l'utilisation d'un instrument comme le broyeur de type Polytron pour briser les cellules donnerait probablement de meilleurs résultats. Dans un autre ordre d'idée, il serait intéressant de tester le rendement que donneraient des essais enzymatiques faits directement sur l'homogénat cellulaire, évitant des étapes potentiellement perturbantes comme l'ultracentrifugation de 60min. Enfin, il serait de mise de vérifier l'efficacité du tampon de congélation des suspensions microsomaux à conserver l'intégrité des protéines enzymatiques à court, moyen et long terme, ou, si possible, de procéder aux essais enzymatiques sur des microsomes fraîchement préparés. L'utilisation du modèle cellulaire P19 pour l'étude du métabolisme des l'AR reste malgré tout une avenue très intéressante à explorer. Une fois la méthode bien établie, ce bioessai pourrait devenir un moyen rapide, simple et efficace pour mieux cerner les mécanismes entourant le potentiel tératogène associée à l'AR.

CONCLUSION.

À ce jour, le déclin mondial des populations d'amphibiens est devenu une préoccupation importante pour la communauté scientifique. Le futur incertain de certaines espèces a amené plusieurs chercheurs à investiguer les causes probables de ce déclin. L'augmentation de l'incidence des cas de grenouilles difformes en milieu agricole a orienté les recherches vers de probables effets tératogènes des pesticides et fertilisants utilisés en agriculture.

Les travaux présentés dans ce document ont été entrepris pour explorer les mécanismes sous-jacents à l'apparition de malformations chez les amphibiens. Les recherches présentées, que ce soit concernant l'effet des pesticides et fertilisants agricoles sur l'efficacité d'oxydation de l'AR en métabolites polaires ou l'exploration de cette même réaction enzymatique sur un modèle cellulaire, représentent une contribution considérable en ce qui a trait à l'étiologie des malformations associée au métabolisme de l'AR. De plus, de nouvelles connaissances sur le métabolisme des rétinoïdes chez le ouaouaron ont pu être apportées.

Les résultats présentés dans la première série d'expérimentations (Chapitre II) avaient pour objectif de cerner un mécanisme par lequel un déséquilibre dans les concentrations d'AR actif peut engendrer des malformations chez les amphibiens vivant en milieu agricole. Selon l'hypothèse que l'activité des enzymes responsables de l'inactivation de l'AR en métabolites polaires soit affectée par la présence de pesticides et fertilisants agricoles, l'efficacité du catabolisme de l'AR par les microsomes hépatiques de ouaouaron a été comparée selon un gradient d'exposition des grenouilles à la contamination agricole. Le travail effectué a d'abord permis de mettre au point un protocole pour doser les différents métabolites formés suite à l'oxydation de l'AR.

Une caractérisation partielle a permis, pour la première fois, de mettre en évidence des valeurs de K_m et V_{max} ainsi que l'existence d'un substrat préférentiel, le 13-*cis*-AR, relatifs à l'activité enzymatique. De plus, deux inhibiteurs non spécifiques des CYP450 ont été testés avec succès, démontrant l'implication de ces enzymes dans le catabolisme de l'AR. Lors de l'étude comparative, des résultats concernant les femelles sont parus pour la première fois. Comme l'hypothèse le suggérait, il a été observé que les moyennes pour la réaction catabolique, le poids du foie ainsi que la concentration en protéines des suspensions microsomales chez les femelles était significativement plus élevées que chez les mâles, un phénomène probablement dû à la coïncidence entre le moment de l'échantillonnage et celui de la fabrication des œufs chez les femelles. De façon générale, les grenouilles associées aux sites les plus contaminés ont démontré une augmentation de l'activité d'oxydation, et ce, chez les deux sexes. Pour l'ensemble des ouaouarons capturés, la longueur museau-cloaque semblait diminuer selon le gradient d'activité agricole, suggérant possiblement des problèmes au niveau de la croissance des animaux. Ces résultats suggèrent donc un potentiel perturbateur de la contamination agricole sur l'homéostasie de l'AR, une situation potentiellement tératogène lorsque vécue au moment du développement embryonnaire.

La seconde partie de ce projet (Chapitre III) se voulait une étude exploratoire du catabolisme de l'AR sur les cellules P19 dans l'objectif de leur utilisation future comme bioessai pour tester le potentiel tératogène de contaminants ciblés. Bien que la réaction d'oxydation de l'AR n'ait pu être reproduite, comme prévu, de façon stable dans notre laboratoire, l'expérimentation aura apporté plusieurs suggestions pour de prochaines tentatives. À partir d'un protocole établi et publié, certaines modifications ont été tentées. Différentes concentrations en protéines microsomales et en substrat ont été testées en vain. Plusieurs méthodes d'extraction pour les rétinoïdes ont aussi été tentées. Le protocole pour la culture des cellules P19 ne semblait pas être la source des problèmes rencontrés.

Toutefois, la quantité de matériel cellulaire nécessaire à l'obtention d'une concentration en protéines microsomales adéquate pour les essais s'est avérée exagérément grande pour le faible rendement enzymatique obtenu. À partir de ces constatations, une mise au point de la méthode de préparation des microsomes cellulaires a été suggérée. L'utilisation d'un broyeur de type Polytron serait probablement de mise pour augmenter le rendement protéique à partir des culots cellulaires récoltés. Dans un autre ordre d'idée, il serait conseillé de tenter l'expérience sur des homogénats cellulaires plutôt que sur la fraction microsomale des cellules, de façon à éviter des étapes potentiellement perturbantes pour l'intégrité des protéines enzymatiques, comme l'est l'ultracentrifugation différentielle. Malgré l'échec de la reproductibilité et de l'optimisation de la méthode dans notre laboratoire, il n'en reste pas moins que l'utilisation des cellules P19 comme modèle cellulaire à l'étude des mécanismes impliqués dans l'émergence des malformations associée aux concentrations cellulaires effectives d'AR représente une avenue prometteuse.

Cette première étude de l'efficacité catabolique des *CYP450* sur l'AR chez les ouaouarons, ainsi que l'effet de la contamination agricole sur celle-ci, ne représente qu'une infime partie des nombreux mécanismes possiblement impliqués dans la tératogénie de l'AR. Plusieurs enzymes, sous différents isomères, catalysant la transformation de plusieurs types et formes de substrats, sont impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes. La présente étude a permis de mieux cerner l'un de ces mécanismes tout en proposant une alternative *in vitro* à l'obtention de réponses plus complètes en ce qui a trait aux facteurs liés au déclin des amphibiens.

ANNEXES

ANNEXE 1	
Exemple de chromatogramme.	70
ANNEXE 2	
Pesticides dosés dans les différents sites d'échantillonnage.	71
Nutriments dosés dans les différents sites d'échantillonnage en 2007.	74
Nutriments dosés dans les différents sites d'échantillonnage en 2008.	75
ANNEXE 3	
Effectifs de capture.	76
ANNEXE 4	
Article associé publié dans <i>Aquatic Toxicology</i> en 2009.	77

ANNEXE 1

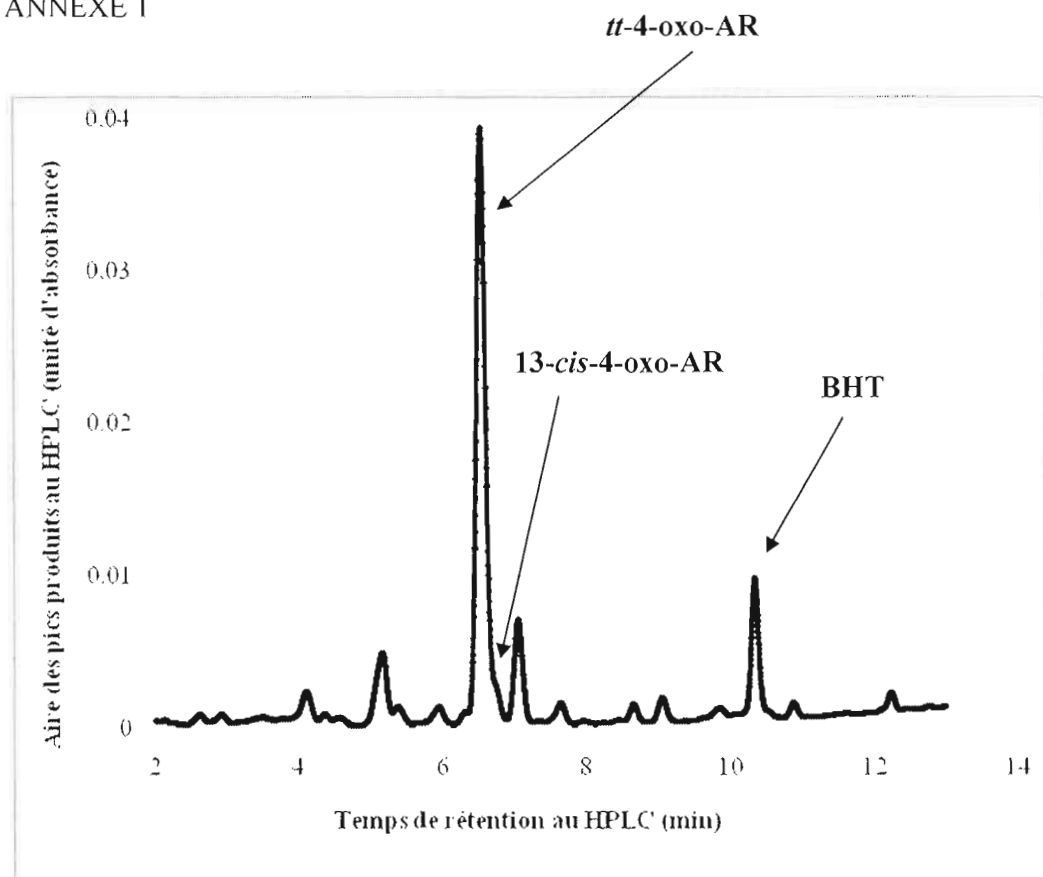


Figure A-1. Exemple de chromatogramme suite à l'injection du produit de l'essai enzymatique au HPLC (Waters).

ANNEXE 2

Tableau A-I. Pesticides dosés dans les différents sites d'échantillonnage en 2007 et en 2008.

Les chiffres en gras représentent une mesure qui dépasse la limite de détection de la méthode.

[illegible]

Tableau A-II. Nutriments dosés dans les différents sites d'échantillonnage en 2007.

Sites	Date de prélèvement; 4 juillet 2007									
	pH	T° °C	Cond. µS	NO ₃ +NO ₂ ^a mg/l -- N	NO ₂ ^a mg/l -- N	NO ₃ ^a mg/L -- N	P (Total) ^b mg/l -- P	COD mg/L-- C	Turbidité	
Deborah Stairs	7.2	19.9	318	0.019	0.009	0.010	0.015	7.6	UTN 4.6	
Yamaska-Nord (Lac Boivin)	7.1	20.2	729	0.176	0.036	0.140	0.021	5.7	7.5	
Yamaska (Farnham)	9.18	23.6	536	0.6	0.6	< 0,005	0.12	7.9	12	
Pot-au- Beurre*	7.47	17.6	523	0.54			0.14	11.4	48	
Rivière Noire	8.4	22.8	605	0.710	0.1	0.61	0.13	7.3	4.4	
Rivière à la Barbue	8.45	22	1219	0.399	0.019	0.38	0.03	7.3	5.8	
Limite de détection de la méthode (CEAEQ)				0.007	0.002	0.005	0.01	0.2	0.1	

^a La valeur pour les nitrates et les nitrites est en mg/litre d'atome d'azote, on peut ÷ par 14 pour obtenir la molarité
^b Phosphore = valeur totale dans l'échantillon (Persulfate). On peut ÷ par 15 pour obtenir en molarité
* Pour le site Pot-au-Beurre, les valeurs de nitrites et de nitrates n'ont pas été séparées à l'analyse, nous ne disposons que de la valeur totale

Tableau A-III. Nutriments dosés dans les différents sites d'échantillonnage en 2008.

Sites	Date de prélèvement; 7 juillet 2008									
	pH	T° °C	Cond. µS	NO ₃ +NO ₂ mg/l -- N	NO ₂ mg/l -- N	NO ₃ mg/L -- N	P (Total) mg/l -- P	COD mg/L-- C	Turbidité	
Deborah Stairs	7,73	22,5	136	0,006	< 0,0006	< 0,005	0,019		UTN (LD=0,1)	9
Lac Boivin	9,46	24,1	198	0,006	< 0,0006	< 0,005	0,15			10
Yamaska (Farnham)	8,52	25,2	276	3,716	0,016	3,7	0,048			10
Pot-au-Beurre				1,934	0,034	1,9	0,091	11		ND
Rivière Noire	8,14	24,7	214	5,430	0,03	5,4	0,081			10
Rivière à la Barbue	7,81	24,6	549	6,962	0,062	6,9	0,15			35
Réservoir Choinière	8,28	23,8	132	0,686	0,006	0,68	0,013			8
Limite de détection de la méthode (CEAEQ)				0,006	0,0006	0,005	0,01	0,2		0,1

La valeur des nutriments pour les nitrates et les nitrites en mg/litre d'atome d'azote, on peut ÷ par 14 pour obtenir la molarité
Phosphore = valeur totale dans l'échantillon (Persulfate). On peut ÷ par 15 pour obtenir en molarité

ANNEXE 3

Tableau A-IV. Effectifs de capture pour 2007 et 2008.

Sites	2007		2008	
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Lac Boivin	6	6	6	6
Deborah	8	3	9	3
Stairs				
Pot-au-Beurre	11	1	10	2
Yamaska	5	5	6	6
(Farnham)				
Réservoir	6	6	11	1
Choinière				
Rivière Noire	7	4	9	3
Total-sexe	43	25	51	21
Total-année	68		72	

ANNEXE 4

Aquatic Toxicology 91 (2009) 118–125



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquattox

Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination

Monique Boily^{a,b,*}, Janik Thibodeau^a, Marjolaine Bisson^a

^a TOXEN Research Centre, University of Québec at Montréal, Case Postale 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

^b Centre interuniversitaire de recherche en écotoxicologie (CIREE), 531, boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 3B7

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 May 2008

Received in revised form 11 November 2008

Accepted 11 November 2008

Keywords:

Frog

Retinoids

REH

LRAT

Agricultural contaminants

ABSTRACT

Retinoids have been extensively studied in birds, fish and mammals where their imbalances are associated with adverse effects on growth and reproduction along with decreased embryo survival and deformities. Organochlorine compounds may alter the retinoid system but little is known about the effects of agricultural contaminants on their metabolism. In the Yamaska River project, the retinoid system in bullfrogs is monitored to investigate the possible impact of agricultural contaminants on retinoid homeostasis. Retinoids were measured in liver and plasma of male bullfrogs collected from six locations subject to increasing agricultural activity in the Yamaska River watershed. Bullfrogs living in medium and high agricultural activity areas demonstrated lower hepatic retinyl palmitate and higher hepatic retinol levels when compared to frogs associated with low contaminated sites. Changes in the concentration of hepatic esters could be related to an altered activity of REH or LRAT, enzymes respectively linked to the hydrolysis of retinyl palmitate and the esterification of retinol. A partial characterization and the analysis of liver microsomal REH and LRAT showed significantly higher hydrolysis and lower esterification activities in highly contaminated sites. Enzymatic activities seemed to be influenced by plasma DROH but not by plasma retinol. Bullfrogs from the most contaminated sites showed altered retinoid metabolism that should increase concern for frogs living in intensive agricultural areas.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Around the world, frogs have experienced population and diversity declines. Among the several factors possibly involved, the loss of habitat and the contamination of water are regularly cited (Houlahan et al., 2000; Crump, 2001). In agricultural areas, marshes and ponds have been drained and the remaining water bodies are exposed to residues of agricultural practices such as nutrients, metals and pesticides which have been suspected to adversely influence frogs populations (Porter et al., 1999; Davidson et al., 2002; Sullivan and Spence, 2003; Camargo et al., 2005).

To explore the health status of the frogs living in agricultural ecosystems, a major study began in 2003 in the Yamaska River basin, Québec. This first campaign, using the bullfrog as the

target species, revealed that body weight and retinoids (hepatic and plasmatic) were altered by factors associated with intensive agricultural activities (Boily et al., 2005; Bédubé et al., 2005). The term 'retinoid' refers to a group of endogenous or synthetic molecules structurally similar to retinol (vitamin A). Retinoids have been extensively studied in birds, fish and mammals where their imbalances were associated with growth inhibition, decreased embryo survival and deformities along with numerous other effects on reproduction (Blomhoff et al., 1991; Rolland, 2000; Boily et al., 2004). In North America, high numbers of deformed frogs have been reported in agricultural areas (Guélet et al., 1997; Gardiner et al., 2003). Possible causes of these deformities are reminiscent of those produced in experiments with animals that alter the retinoid signalling pathway. It is therefore relevant to investigate whether agricultural contaminants affect retinoid homeostasis.

The main target of research in this paper is retinoid metabolism in the liver. The hepatic stock of retinoids is of prime importance for the wild frog. The liver is involved in the uptake and the metabolism of 'biologically active' vitamin A molecules, their concentration in plasma and their delivery to extrahepatic tissues. The concentration of retinoids in the liver may be influenced by the nutritional status and the age of the animal, but numerous studies conducted

Abbreviations: ROH, retinol; DROH, all-trans-3,4-didehydroretinol; RALDH, retinal dehydrogenase; LRAT, lecithine:retinol acyltransferase; REH, retinyl ester hydrolase; RA, retinoic acid; RP, retinyl palmitate; RBP, retinol-binding protein; TTR, transthyretin.

* Corresponding author at: TOXEN Research Centre, University of Québec at Montréal, Case Postale 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8. Tel.: +1 514 987 7000/5605; fax: +1 514 987 4647.

E-mail address: boily.monique@uqam.ca (M. Boily).

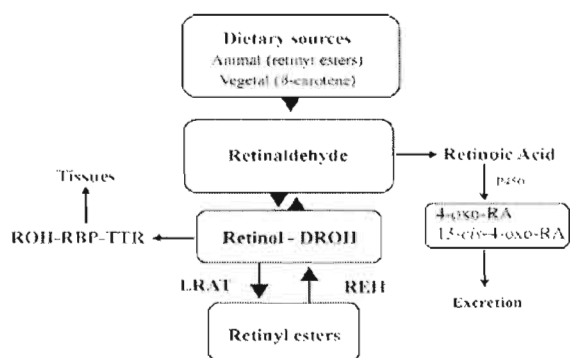


Fig. 1. Basic vertebrate retinoid metabolism.

in the wild and in the laboratory have reported that retinoids are also affected by organochlorine compounds such as polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons (Spear and Bourbonnais, 2000). These effects could be the consequence of indirect alteration of enzyme activities closely related to retinoid metabolism (Fig. 1). Two enzymes play a fundamental role in building up and metabolising the hepatic stock: the retinyl ester hydrolase (REH) and the lecithine retinyl acyl transferase (LRAT). The REH hydrolyses the esterified retinoids to retinol which is then bound to a specific protein, retinol-binding protein (RBP) and delivered to cells and tissues via the circulatory system. Because a large amount of retinol may exert cytotoxic effects, the retinol in excess is esterified by LRAT and stored in different organs, predominantly the liver. In laboratory experiments conducted with rats, fish or yolk sac membranes of the Japanese quail, REH or LRAT activity proved to be sensitive to organochlorine exposure (Nilsson et al., 1996; Ndayibagira and Spear, 1999; Boily et al., 2003a,b). The hydrolysis–esterification balance was examined in many organs and for several species in order to lead to a better understanding of the complex and highly regulated retinoid system. So far, the potential effects of non-persistent agricultural contaminants on retinoid metabolism have not been investigated despite the fact that pesticides are widely used and that exposure is not limited to spray drift; food chain and water contamination also contribute to total exposure. Our previous study conducted in 2003 in the Yamaska River basin showed altered hepatic retinoids related to a gradient of agricultural contamination (Boily et al., 2005). The present paper involves field collections in 2004 in which the study of hepatic and plasma retinoids is extended to include factors that influence storage and metabolism: REH and LRAT enzymatic activities.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Retinoids (all-*trans*-retinol and all-*trans*-retinyl palmitate without BHT), Triton X-100, butylated hydroxytoluene (BHT), L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP) and fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate zwitterionic (CHAPS) was obtained from Boehringer Mannheim Co. HPLC-grade solvents were from Fisher Scientific (Montréal, Québec).

2.2. Study area

Samples were collected during the summer of June and July, 2004, in six locations within the Yamaska River basin (Bérubé et al., 2005; Spear et al., in press). These sites were selected according to their agricultural activity and the contamination of the sub-watershed (Primeau et al., 1999). The two sites associated with low agricultural activity (0–19% of land surface used for crop farming), were Deborah Stairs (DS) and Yamaska-Nord (YN). The Rivière-Pot-au-Beurre (PB) and Yamaska River (YA) were sites classed as medium (20–59% of land surface used for crop farming) while Rivière Noire (RN) and Rivière à-la-Barbue (RB), with more than 60% of their land under corn cultivation and extensive pig production, were representative of high agricultural activity.

2.3. Capture of the frogs and liver sampling

Bullfrogs were captured as described previously for the 2003 sampling (Boily et al., 2005; Spear et al., in press). Briefly, the blood sample was obtained from each frog via the femoral artery under anesthesia, with the blood volume collected determined as 7.1 ml/kg body mass. Frogs were then euthanized by cervical severance. The liver was quickly removed, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

2.4. Preparation of microsomes

Microsomes were prepared using 0.5 g of liver tissue homogenized in 2 ml Tris–KCl buffer (0.15 M KCl, 50 mM Tris–HCl, pH 7.4). The homogenate was centrifuged at $10,000 \times g$ for 20 min and the supernatant was centrifuged at $100,000 \times g$ for 60 min. The pellets were resuspended in 180 μl of buffer (0.25 M sucrose, 0.15 M KCl, 50 mM Tris, pH 7.0) for the REH and LRAT assays. Once prepared, the microsomes were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . All the steps of microsome preparation were performed at $0-4^{\circ}\text{C}$. Protein concentration was determined according to the method of Lowry et al. (1951) using a bovine serum albumin as standard.

2.5. REH assays

Analyses of REH and LRAT were conducted under yellow incandescent light to prevent isomerization of retinoids. A stock solution of 1.0 mM retinyl palmitate (without BHT) in hexane, was kept at -20°C . Each reaction tube (12 ml screw top borosilicate) received 50 μl of the retinyl palmitate stock solution. The hexane was then evaporated to dryness at 45°C under a gentle flow of nitrogen gas. This procedure ensured a precise amount of substrate in each tube and circumvented problems of solvent interactions and retinyl palmitate insolubility. The stock solution was checked regularly for purity and the volume placed in the reaction tubes adjusted accordingly. Retinyl palmitate substrate was then dispersed in the reaction medium (0.2% Triton X-100, 50 mM Tris, 0.15 M KCl, pH 7.0). The tubes were vortexed for 5 s and the reaction was initiated with a 60 μl aliquot of the microsomal preparation (approximately equivalent to 185 μg of protein) resulting in a total incubation volume of 250 μl . This reaction was maintained at 27°C with constant shaking, for 90 min, then terminated by adding 0.5 ml ice-cold ethanol. For characterization of the enzyme, all incubations were performed in five replicates (i.e. from five different pools) and the activity was expressed (unless otherwise noted) in nmole of hydrolysed retinol formed per hour for 1.0 mg of protein.

Retinol was extracted using 1.2 ml hexane–BHT (0.01%). After centrifugation, 1.0 ml was evaporated to dryness and resuspended in 200 μl MeOH containing 0.01% BHT for analysis by HPLC by injecting 60 μl . Endogenous retinol in microsomes was approxi-

mately 1.0% of the total retinol and did not increase in blank tubes incubated without substrate. In the absence of microsomes, a slight retinol peak was detected (presumably an impurity in the retinyl palmitate substrate) and this background was systematically corrected for. The variability of the assay, measured in aliquots of the same pool of microsomes on different days was found to be 7% (coefficient of variation) indicating that the assay was highly reproducible.

2.6. LRAT assays

A stock solution of DPPC (250 μ M) was prepared in 0.1 M Tris buffer with BSA (2.5%) and adjusted to pH 7.0. This mixture was sonicated on ice for 45 min and preserved in aliquots at -80°C . A stock solution of all-*trans*-retinol was prepared in MeOH (0.1 mg/ml) and kept at -20°C . Before the LRAT assay, 0.1 ml of this solution was evaporated to dryness under nitrogen gas and resuspended in 150 μ l DMSO. A 5 μ l aliquot of retinol in DMSO (equivalent to 5 μ M of ROH in the final assay) was added to 50 μ l of DPPC stock solution in BSA, thawed, then vortexed for 1 min. The mixture was vortexed again with 170 μ l of 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.0, for 1 min and pre-incubated at 27°C for 10 min. The reaction was started by adding a 25 μ l microsome aliquot (previously thawed and pre-incubated with 2 mM of TCEP for 10 min at room temperature). All tubes were then vortexed for 1 min and incubated in a shaking water bath (27°C) for 20 min. The reaction was stopped with 0.5 ml ice-cold EtOH followed by vortexing for 1 min. Next, 100 μ l distilled water was added and the tubes vortexed for 30 s. Retinyl palmitate was extracted twice using 2 ml of hexane-BHT. A fraction of the combined organic phase (1.0 ml) was evaporated to dryness before resuspension in 200 μ l MeOH containing 0.01% BHT for analysis by HPLC by injecting 60 μ l. Blank incubations without retinol were used to correct for endogenous retinyl palmitate. Assays were performed in 5 replicates (otherwise noted).

2.7. Age of frog

Based on the skeletochronological aging techniques of Leclair et al. (2000, 2005), appropriate bone samples were collected from the male bullfrogs. The phalanges (3rd of the 4th hind foot digit) and femurs collected were partially decalcified, processed to produce slides and stained with Ehrlich's hematoxylin to identify the lines of arrested growth (LAG). This technique permitted aging based on the number of LAGs, changes which occur as a result of the annual cycle. Even though this particular technique has not been used previously on bullfrogs, it has been validated in this species (Spear et al., 2009).

2.8. Retinoid analyses

The extraction procedure for retinoid analyses was modified from that of Spear and Moon (1986). Briefly, 0.2 g of bullfrog liver was dehydrated by grinding with 2 g of anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4). Extraction was achieved by adding 5 ml hexane and mixing for 10 min. After centrifugation (2 min at $2000 \times g$) a 500 μ l aliquot was evaporated to dryness at 45°C under a gentle stream of nitrogen gas. The extract was redissolved in 200 μ l acetonitrile and 50 μ l was injected into the HPLC. All retinoid analyses were conducted under yellow incandescent lights to prevent isomerization.

Hepatic retinoids were separated and detected using HPLC as described in Bolly et al. (2005). The peaks for retinol and retinyl palmitate were identified by comparing with authentic commercial standards. Oleate and palmitate esters co-eluted under these HPLC conditions and were quantified together as the palmitate esters.

The peaks for retinyl laurate, myristate, linoleate, and stearate were identified by standards synthesized in our laboratory and quantified using the standard curve for retinyl palmitate corrected for molecular weight. The sum of concentrations of the individual retinyl esters, expressed in nmoles per gram (nmol/g), is referred to as 'total ester' concentration or overall retinoid storage. Blood retinoids were detected according to Bérubé et al. (2005).

Retinoid extracts from hepatic enzyme activities were injected into a reverse-phase HPLC system consisted of a Millennium program loaded onto a Pentium II computer, a model 510 pump, a model 486 absorbance detector set at 325 nm and a model 7725i (Rheodyne) injector. Retinol formed from the retinyl palmitate substrate (REH) was separated on an Inertsil C18 analytical column using gradient elution with solvent A (97% MeOH, 3% water) and solvent B (58% MeOH, 38% THF, 3% water). The gradient program with a flow rate of 1 ml min^{-1} was: 100% A for 5 min, followed by a linear 2-min gradient to 100% B, then isocratic 100% B for 6 min. At 13 min, a linear gradient returned the mobile phase to 100% A over a 2-min period and isocratic 100% A was maintained for an additional 5 min. Under these conditions, the retention time for retinol was 4.2 min. This method ensured the elution of the substrate retinyl palmitate (13.6 min) with each injection, preventing

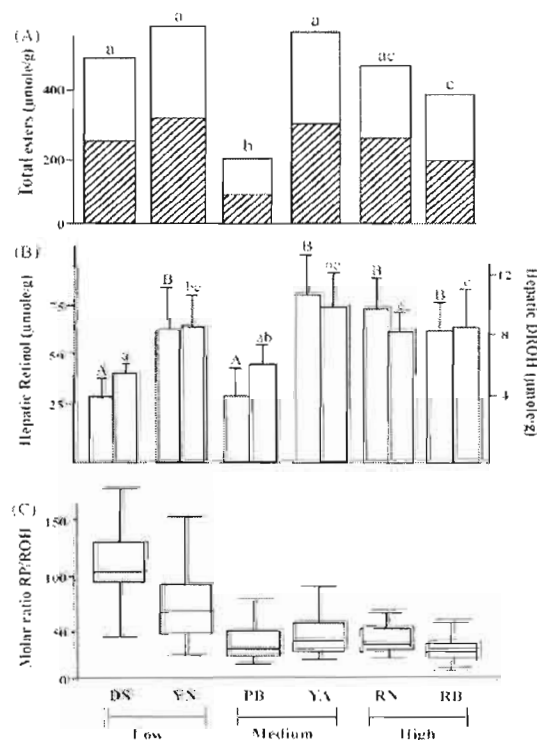


Fig. 2. Retinoid concentrations in the liver of bullfrogs from Yamaska River basin. (A) Retinyl palmitate (□), other esters (▨). Univariate analysis of variance, Tukey's $\alpha < 0.05$. Each bar represents the mean, $n = 14$. (B) Retinol (□), DRPH (▨). Univariate analysis of variance, Tukey's $\alpha < 0.05$. Each bar represents the mean and S.D., $n = 14$. (C) Retinyl palmitate/retinol, molar ratio, Kruskal-Wallis test, $n = 95$, $p < 0.001$. Boxes extend from 25th to 75th percentile, line is the median and whiskers show the distribution from the largest to smallest observed values.

Table 1

Mean and (S.D.) of plasma retinoids in bullfrogs from the Yamaska River basin, 2004. Values with the same letter within a column are not significantly different ($p > 0.05$).

Sites	Retinol ($\mu\text{g/ml}$)	DROH ($\mu\text{g/ml}$)	13- <i>cis</i> -4-oxo-RA (ng/ml)
Delson Stairs (DS)	19.6 (1.6) ^a , $n = 16$	0.47 (0.03) ^a , $n = 16$	77.4 (52) ^a , $n = 10$
Yamaska-Nord (YN)	17.3 (1.9) ^a , $n = 16$	0.81 (0.09) ^a , $n = 16$	517 (219) ^a , $n = 5$
Pot-au-Beurre (PB)	17.8 (1.5) ^a , $n = 14$	0.54 (0.03) ^a , $n = 15$	34 (11) ^a , $n = 5$
Yamaska (YA)	17.7 (1.2) ^a , $n = 15$	0.67 (0.03) ^a , $n = 15$	3071 (5391) ^a , $n = 16$
Rivière Noire (RN)	15.3 (1.6) ^a , $n = 15$	0.79 (0.03) ^a , $n = 11$	157 (129) ^a , $n = 11$
Rivière à la Barbe (RB)	13.3 (1.3) ^a , $n = 15$	0.85 (0.09) ^a , $n = 15$	1475 (135) ^a , $n = 10$

^a $p \leq 0.1$.

its accumulation in the analytical column. Retinyl palmitate resulting from the LRAT activity was detected using isocratic conditions. The mobile phase was 59% MeOH, 38% THF and 3% water, with a flow rate of 1 ml min⁻¹. Retinyl palmitate product was detected at 5.6 min.

2.9. Statistical analysis

Mean values for body mass, liver weight, liver retinoid concentrations, REH and LRAT activities were compared between sites using a one-way analysis of variance. When the model was significant, multiple comparisons were conducted using the Tukey test. When the assumption of normality appeared suspect, and no transformation of the data was effective to ensure normal distribution, non-parametric tests were applied for comparing groups based on chi-square approximation of the Kruskal–Wallis test. Spearman correlation matrix was tested on combined data from the low intensity sites (DS, YN) and another correlation matrix tested on the data from moderate and high intensity sites (PB, YA, RN, RB). In the case that the same variables were correlated in the two matrices, the relationship was considered not to be influenced by agricultural activity. Statistical analyses were performed using SPSS[®] software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Hepatic and plasma retinoid levels

In the liver, the major form of esterified retinoids was retinyl palmitate which accounted for 50% of total esters (Fig. 2A). The retinyl palmitate concentration tended to be higher for sites associated with low agricultural activities ($F_{5,35} = 29.96$, $p < 0.001$). The low contamination sites, DS and YN had significantly higher values than PB site (medium) and RB (high). The lowest concentration found at PB was significantly different from all other sites. Retinol

concentrations were also significantly different among sites as the YA, RN and RB sites showed higher values compared to DS and PB locations ($F_{5,35} = 7.69$, $p < 0.001$) (Fig. 2B). When the molar ratio of retinyl palmitate to retinol was examined, all medium and high sites demonstrated lower values compared to low sites (chi-square = 46.02, $p < 0.001$) (Fig. 2C). When sites were grouped according to their contamination burden (see Section 2), retinyl palmitate correlated positively with hepatic retinol in both groups (group I, $r = 0.57$, $p = 0.002$, $n = 27$; group II, $r = 0.64$, $p = 0.001$, $n = 61$). In group II only, retinyl palmitate correlated positively with age ($r = 0.44$, $p = 0.001$, $n = 58$) and hepatic retinol was negatively correlated with liver weight ($r = -0.37$, $p = 0.003$, $n = 62$).

Plasma retinoid data (Table 1) show the major forms of vitamin A: retinol, DROH and one metabolite, 13-*cis*-4-oxo-RA. Only the RB site showed a statistical tendency to have a lower retinol than the DS site (Tukey $p = 0.08$). All-*trans*-3,4-didehydroretinol was found in every sample but only in low concentrations. Nevertheless, significant differences were revealed between sites, the lowest value associated with bullfrogs living in the reference site. When the 13-*cis*-4-oxo-RA metabolite was compared between sites, only YA and RB were statistically different from the pesticide-free site. DS and from the medium contaminated site, PB ($F_{5,78} = 4.62$, $p < 0.01$).

While no correlation implicating retinol was found within the low contaminated group, a slight negative relationship was observed between plasma retinol and hepatic retinol in the medium-high contaminated group ($r = -0.37$, $p < 0.02$, $n = 57$) (Table 2). In both groups (low and medium-high), DROH was positively correlated with retinyl palmitate and hepatic retinol but negatively correlated with liver weight and positively correlated with plasma retinol in the medium-high contamination group.

3.2. REH and LRAT activities

The retinyl ester hydrolase was more active in pH conditions between 7.0 and 9.0 reaching a maximum at 7.0 (Fig. 3A). The

Table 2

Frog mass, age, hepatic retinoids, and plasmatic retinoids variables: correlations and descriptive statistics. Upper right = low contamination: DS and YN. Down left = medium and high contamination: PB, YA, RN and RB.

Variables	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. Frog mass	–	.66**	.30	.31	.28	.19	–.03	.14	.02	.19	.59*
2. Age	.64**	–	.04	.15	.28	.21	.23	.42*	–.08	.20	.23
3. Liver weight	.61**	.19	–	–.16	–.37**	–.51**	–.24	–.36	.32	–.51**	.97
4. Retinyl palmitate	.30*	.44**	–.31*	–	.57**	.56**	–.21	.05	–.22	.56**	.25
5. Hepatic retinol	.15	.31*	–.37**	.64**	–	.85**	.16	.53**	–.07	.48**	.08
6. Hepatic DROH	–.10	.05	–.39**	.41**	.79**	–	.20	.41*	–.26	.10**	.07
7. REH	–.14	.08	–.55**	.69**	.59**	.58**	–	.23	.19	.20	.04
8. LRAT	–.12	.19	–.45**	.47*	.62**	.63**	.27	–	.09	.41*	.13
9. Plasma retinol	.18	–.12	.31*	–.21	–.32*	–.32*	–.47*	–.69**	–	–.26	–.51
10. Plasma DROH	–.09	.10	–.43**	.45**	.84**	1.0**	.68**	.63**	–.50**	–	.07
11. 13- <i>cis</i> -4-oxo-RA	–.12	.23	–.33*	.14	.06	.03	.42	.27	.08	–.11	–

* $p < 0.05$.** $p < 0.01$.*** $p < 0.001$.

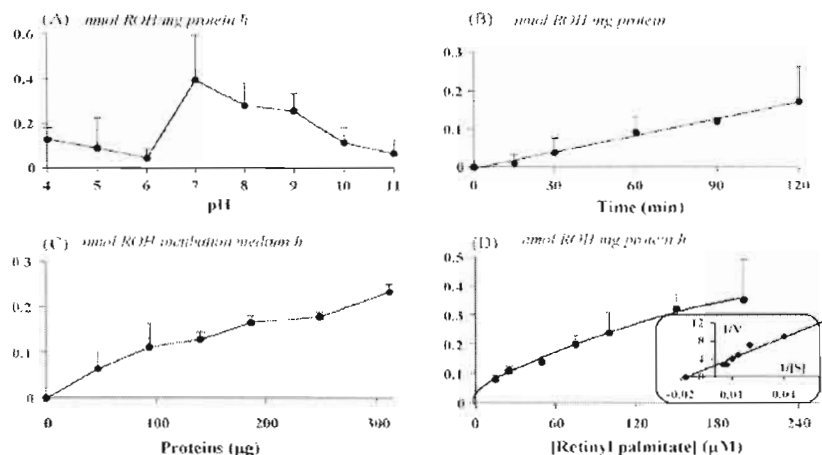


Fig. 3. Assay conditions for measuring REH activity. Bullfrog liver microsomes were incubated at 27 °C, final volume 250 µl. Effect of (A) pH, (B) incubation time, (C) protein concentration, and (D) retinyl palmitate concentration on REH activity. Kinetic parameters (Lineweaver–Burk plot), inset D.

hydrolysis of all-*trans* retinyl palmitate as a function of incubation time is shown in Fig. 3B. The 90-min incubation was selected as being in the linear portion of the curve and showing the smallest coefficient of variation. A relatively large range of protein (45–300 µg) was used to increase the REH activity and the lower concentrations showed a higher coefficient of variation (Fig. 3C). Although a higher rate of hydrolysis was observed with largest amount of proteins, a 60 µl of microsomal suspension (± 185 µg protein) was routinely used for all assays. The effect of increasing concentration of all-*trans* retinyl palmitate on REH activity is depicted in Fig. 3D. For a substrate concentration of 200 µM, a plateau was not reached. Higher concentrations lead to reduced hydrolysis activity and maximized coefficient of variation (data not shown). Based on optimum pH, time and protein set conditions, an apparent K_m of 57.9 µM was found and a V_{max} of 0.35 nmol of retinol

formed/mg protein/h was determined (inset, Fig. 3D). REH activity was not stimulated by the bile salt analogue CHAPS; concentrations from 50 mM to 150 mM reduced the rate of hydrolysis from 20% to 57% (data not shown).

LRAT activity was also higher in alkaline incubation conditions as shown in Fig. 4A. The time-dependent esterification activity increased more or less linearly for 20-min incubation period. After this time, the activity tended to decrease as depicted in Fig. 4B. A 20-min incubation was selected for all LRAT assays. The esterification activity increased in a linear fashion by an increasing amount of proteins (Fig. 4C). With 10 µM of all-*trans*-retinol as substrate, the LRAT activity demonstrated typical Michaelis–Menton kinetics (Fig. 4D). An apparent K_m of 1.79 µM and a maximum velocity of 11.4 nmol of retinyl palmitate were values derived from Lineweaver–Burke plot (inset, Fig. 4D).

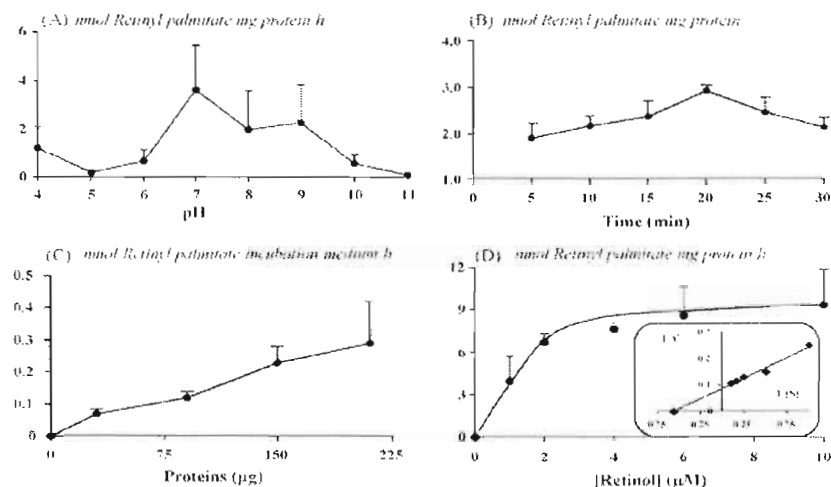


Fig. 4. Assay conditions for measuring LRAT activity. Bullfrog liver microsomes were incubated at 27 °C, final volume 250 µl. Effect of (A) pH, $n = 3$, (B) incubation time, (C) protein concentration, (D) retinol concentration on LRAT activity. Kinetic parameters (Lineweaver–Burk plot), inset D.

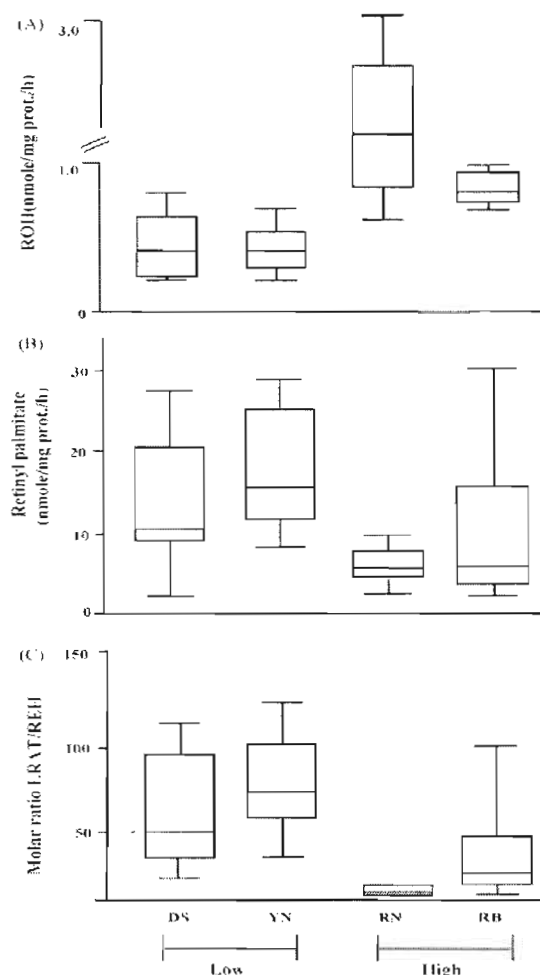


Fig. 5. Enzyme activities assayed in bullfrog liver microsomes from the Yamaska River basin. REH and LRAT activity in samples from low and high contaminated sites were compared using Kruskal–Wallis test. Boxes extend from 25th to 75th percentile, line is the median and whiskers show the distribution from the largest to smallest observed values. (A) REH activity, (B) LRAT activity, and (C) molar ratio of the esterification:hydrolysis activity.

3.3 REH and LRAT activities from the Yamaska River's bullfrogs

REH and LRAT activities were measured in bullfrogs from all sites. However, two sites were excluded from the statistical analysis. The YA site which lacked samples ($n=3$) and RB for which REH and LRAT activities could not be clearly demonstrated. The enzymatic activities were then compared between two sites associated to low agricultural contamination, DS and YN, and the two sites representing the worst water quality, RN and RB. The comparison between sites showed statistic differences for hydrolysing activity (Kruskal–Wallis, chi-square = 29.1, $p < 0.001$, $d = 3$, $n = 39$) (Fig. 5A) and esterification activity (Kruskal–Wallis, chi-square = 13.1, $p = 0.004$, $d = 3$, $n = 39$) (Fig. 5B). When the molar

ratio of LRAT/REH was considered, differences were also revealed between sites (Kruskal–Wallis, chi-square = 20.6, $p < 0.001$, $d = 3$, $n = 39$) (Fig. 5C). In low contaminated group (Table 2), no relationship was found between the hydrolysis activity and other parameters however, in the contaminated one, there was a negative relationship between REH and liver weight ($r = -0.55$, $p = 0.003$, $n = 27$) and a positive association with retinyl palmitate ($r = 0.69$, $p < 0.001$, $n = 26$), hepatic retinol ($r = 0.59$, $p = 0.001$, $n = 28$) and plasma DROH ($r = 0.68$, $p < 0.001$, $n = 27$). In both groups, LRAT activity was related to hepatic retinol but in the contaminated group, LRAT activity was positively related with plasma DROH ($r = 0.63$, $p = 0.001$, $n = 26$) and negatively associated with plasma retinol ($r = -0.69$, $p < 0.001$, $n = 26$).

4. Discussion

The results confirmed earlier findings with respect to retinoid concentrations in liver and plasma as well as identifying biochemical mechanisms associated with these observations. Bullfrogs were found to have a similar overall profile of hepatic retinoids as other vertebrates: that is, at least 50% of total esters are retinyl palmitate and retinol is the major non-esterified form. From all sites sampled, the proportion of retinyl palmitate to total esters remained the same.

In examining the hepatic molar ratio of retinyl palmitate/retinol at the different sites (Fig. 2C), it is possible to see a direct relationship to the level of contamination. According to the water analyses, the DS site has undetectable concentrations of all herbicides and best water quality including nitrite ($0.01 \mu\text{M NO}_2\text{-N}$) (Spear et al., 2009), confirming that the frogs from this site are not exposed to pesticides or toxic levels of nutrients. We therefore considered DS to be the reference site which is consistent with highest retinol plasma levels (Table 1) and highest hepatic retinoid ratio (Fig. 2C). Conversely, RB was associated with highest herbicide concentrations, potentially toxic levels of nitrite and very poor water quality (Spear et al., 2009). Frogs from the RB site had the lowest plasma retinol concentrations and the lowest ratio of hepatic retinoids. Our data for molar ratio (Fig. 2C) also indicates that there could be a threshold between the low contamination site of YN and those known to be moderately and highly contaminated. This would mean that minimal contamination is required to exert an apparently substantial impact on the retinoids. Other factors such as age, diet and exposure to OC's contaminants may also have influenced retinoid status and these are discussed below.

The changes in the molar ratio of retinyl palmitate to retinol in the liver (Fig. 2C) were examined in light of two key enzymes involved in the dynamics of liver retinoid accumulation and mobilization. The main aspects of retinoid dynamics under normal physiology (Fig. 1) involve regulation of high dietary retinol by increased net esterification (i.e. greater LRAT:REH activity), whereas low dietary retinol is compensated for by increased net hydrolysis (i.e. lower LRAT:REH activity) effectively mobilizing liver retinol to maintain the supply of retinol to extrahepatic sites. The low contaminated sites DS and YN were found to have greater LRAT activity in comparison with HER in the same individuals (Fig. 5C), suggesting net retinyl palmitate storage. This result is consistent with relatively high retinyl palmitate values in bullfrogs from the low contaminated sites (Fig. 2C). In the high contaminated sites RN and RB, however, the LRAT/REH activity is significantly lower in comparison with the low contaminated sites which, in the absence of other factors, would mean net retinol mobilization and would eventually lower retinyl palmitate levels. These enzyme activities may explain the lower RN and RB retinyl palmitate/retinol molar ratios (Fig. 2C). Thus, between-site differences in LRAT and REH

activities account for the changes in hepatic retinoids. These results suggest an impact on the regulation of hepatic retinoid concentrations by LRAT and REH.

In the case of aquatic vertebrates, research into possible effects by pesticides or water quality on liver retinoid metabolism is at this stage only rudimentary. That retinoid enzymatic activity can be altered by organochlorine compounds (OCs) is well documented in many animal groups: marine mammals, birds and fish, both in the laboratory and the wild (Ndayibagira and Spear, 1999; Rolland, 2000). As a consequence, many forms of retinoids have been used as biomarkers. This study did not analyse OCs. However, a report from the Ministry of the Environment of Québec (Lapierre, 1999) shows the presence of some PCBs and DDTs in several species of fish tissues in the Yamaska region. The levels varied with species, but this study indicated that specimens from RN are less contaminated than those from YN. Given the LRAT/REH activities and hepatic retinoids in bullfrogs from the YN site, it would be reasonable to assume that these OC compounds are not responsible for impacts on these systems, especially at the RN site.

In sites where there are high levels of retinol in the liver, we would expect the same in the blood as it is assumed that the blood levels are, under normal conditions, directly linked to liver levels. Blood levels (Table 1) however, do not support this assumption and the expected increase is in fact a slight decrease. Furthermore, there is no correlation between retinol in the blood and retinol in the liver for the low contamination group (Table 2) and the same parameters are poorly correlated in the medium and high contamination group (-0.32 , $p < 0.05$). These findings indicate that, although liver retinol is available, it may be mobilized less efficiently into the bloodstream. Alternatively, plasma retinol catabolism at peripheral sites (e.g. kidney) may be accelerated at the contaminated sites.

The hepatic retinol level detected at the PB site is comparable to those at DS and from Table 1, plasma retinol is similar to other sites (except RB). This could be the result of a compensatory mechanism to maintain adequate concentration of plasma retinol. In a study with rats exposed to flupentixol, Schindler et al. (2004) observed a decreased in plasma retinol followed by an increase of REH activity. In our study, REH activity in PB could not be clearly demonstrated. The values for retinol formed (mg protein/h) were barely higher than in blank reactions. To explain PB results, other physiological processes could be investigated such as the intestinal absorption or the diet source. All other sites showed statistically higher means than PB and DS, plateauing between $75 \mu\text{mol/g}$ and $80 \mu\text{mol/g}$.

Hepatic DROH is less concentrated in the liver than retinol. However, it is perfectly correlated to plasma DROH ($r = 1.0$), whatever the contamination status of the site (Table 2). Unlike retinol, plasma DROH data seem to follow the contamination gradient, indicating a positive relationship. DROH molecule is structurally different from the retinol molecule, lacking the double bond necessary to the formation of 'cis' retinoid isomers. A few studies have reported that the dehydro-bioactive forms play a significant role in the embryonic development of the chick, zebrafish and *Xenopus* (Kraft et al., 1994; Ross et al., 2000). In adult sturgeon and catfish, more than 90% of their retinoids are present in the DROH forms (Goswami and Barua, 1981). Our data indicate that LRAT activity is positively related to liver and plasma DROH which may indicate other metabolism pathways. This is supported by recent studies where retinol saturation (RetSat) converts retinol to DROH (Moise et al., 2005, 2007).

A curious finding is the wide, between-site fluctuations in plasma levels of the retinoic acid (RA) metabolite, 13-*cis*-4-oxo-RA. The highest concentrations of 13-*cis*-4-oxo-RA occurred at the moderate contaminated site YA and the high contaminated site RB (Table 1). RA and some of its metabolites are known to be biologically potent molecules with respect to gene regulation, transcriptional activation (Beckert and Perkovich, 1999) and mor-

phogenetic influences in embryonic development (Hoffmann and Eichele, 1994; Ross et al., 2000). Under laboratory conditions, avian and amphibian embryos have been observed to express malformations in the presence of RA and the metabolite 4-oxo-RA which mirror those found in amphibians in the wild (Pijnappel et al., 1993; Gardiner and Hoppe, 1999). The metabolite 13-*cis*-4-oxo is the end result of successive transformations: retinaldehyde oxidized to RA by retinal dehydrogenase (RALDH), followed by P450 catabolism to 4-hydroxy-RA and 4-oxo-RA (Moise et al., 2005). The 'cis' forms arise from isomerization. Less potent than other RA forms, 13-*cis*-4-oxo-RA may also be considered teratogenic (Crech Kraft et al., 1991; Tzimas et al., 1994). And, as such, the observed wide fluctuations would not be expected. One might speculate that higher levels of 13-*cis*-4-oxo-RA at the YA and RB sites are the result of greater oxidative activity associated with local contamination.

Many factors, other than environmental contamination, influence the retinoid status of vertebrates, although specific data on amphibians are lacking. With respect to nutrition, the retinoid precursors β -carotene and related carotenoids are potentially ingested as a normal part of the diet of bullfrogs and their contribution to the retinoid status needs to be evaluated. Excessive phosphate and nitrate levels in those Yamaska sites that are associated with moderate and intensive agriculture (Spear et al., 2009) would be expected to promote the growth of macrophytes and algae. Our casual observations confirm the high primary productivity of these sub-watersheds. Thus, carotenoids are expected to be plentiful in foodwebs of the agricultural sites.

Another factor influencing retinoid status is parasitic burden. Liver retinoids may be diminished in animals that are subject to parasitic infections. However, a lower incidence of parasitic infections (i.e. fewer parasite species) was found in the bullfrogs collected from the moderate and intensive agricultural sites (MacGillivray et al., 2009).

Under normal conditions, liver retinyl palmitate concentrations tend to increase with age over the life span of vertebrate organisms. Although this study was restricted to adults, age was positively correlated with retinyl palmitate concentrations for those bullfrogs inhabiting the moderate and high contaminated sites (Table 2). The correlation suggests that age may have been a factor influencing the retinoid status in the present study. However, the relationship is complicated by significant decreases in body length (SVL) at sites PB, RN and RB compared with the low contamination sites, lower growth rate (age versus body length) at the RN site as well as lower body mass and lower rate body mass gain at site RB (Spear et al., 2009). These results indicate that between-site differences in age, length, growth and retinoid status are associated with the moderate and high contaminated sites. In the case of the low contaminated sites where adult male bullfrogs tended to be older, larger and have greater retinyl palmitate/retinol ratios, retinyl palmitate was not correlated with age (Table 2). It is interesting to note the extent to which variables are correlated in the medium-high group. This indicates a complex response to their environmental conditions.

In conclusion, this paper shows that hepatic retinoids are influenced by agriculture activity. To examine possible underlying mechanisms, the optimal assay condition for REH and LRAT are described for *R. catesbeiana*. The results suggest an impact at the level of enzymes regulation.

Acknowledgements

This research was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) under a grant to M. Boily. The authors would like to thank Anicha Nkoua for technical assistance. We are grateful to the Yamaska River Project supported by

the Centre Interuniversitaire de recherche en Écotoxicologie (CIRÉ) for providing tissues and field trip opportunities for students. We thank the Centre de recherche en toxicologie de l'environnement (TOXEN) and Dr. Philip Spear for providing access to his laboratory.

References

- Beckert, B.R., Perkovich, 1999. Evolutionary conservation in retinoid signalling and metabolism. *Am. Zool.* 39, 783–795.
- Bérubé, V., Boily, M., DeBlois, C., Dassylva, N., Spear, P., 2005. Plasma retinoid profile in bullfrogs (*Rana catesbeiana*) from agricultural area in the Yamaska River basin, Québec, Canada. *Aquat. Toxicol.* 71, 109–120.
- Blomhoff, R., Green, M.H., Balmer Green, J., Berg, T., Norum, K.R., 1991. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport and storage. *Physiol. Rev.* 71, 951–990.
- Boily, M., Ndayibagira, A., Spear, P., 2003a. Influence of mono-ortho PCBs on retinoid hydrolase and esterification activities in the yolk sac membrane of Japanese quail eggs. *Comp. Biochem. Physiol. C* 134, 11–23.
- Boily, M., Ndayibagira, A., Spear, P., 2003b. Retinoids, LRAT and REH activities in eggs of Japanese Quail following maternal and in ovo exposures to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Ecotoxicology* 12, 9–21.
- Boily, M., Bisson, M., Spear, P., 2004. Rétinoides: biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques. In: Campbell, G.C., Denizeau, F., Pelletier, É. (Eds.), *Écotoxicologie moléculaire, principes fondamentaux et perspectives de développement*. Ouvrage collectif, Presses de l'Université du Québec, Sainte-Foy, Québec, pp. 197–256.
- Boily, M., Bérubé, V., DeBlois, C., Dassylva, N., Spear, P., 2005. Hepatic retinoids in bullfrogs, *Rana catesbeiana* in relation to pesticide agricultural exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1099–1106.
- Camargo, J.A., Alonso, A., Salamanca, A., 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58, 1255–1267.
- Creech, Kraft, J., Eckhoff, C., Kochhar, D.M., Bochart, G., Chahoud, I., Nau, H., 1991. Isoretinoin (13-*cis*-retinoic acid) metabolism, *cis-trans* isomerization, glucuronidation, and transfer to the mouse embryo: consequences for teratogenicity. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 11, 21–30.
- Crump, D., 2001. The effects of UV-B radiation and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) on the biology of amphibians. *Environ. Rev.* 9, 61–80.
- Davidson, C., Shaffer, H.B., Jennings, M.R., 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, uv-b, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conserv. Biol.* 16, 1558–1601.
- Gardiner, D.M., Hoppe, D.M., 1999. Environmentally induced limb malformations in mink frogs (*Rana septentrionalis*). *J. Exp. Zool.* 284, 207–216.
- Gardiner, D., Ndayibagira, A., Crun, F., Blumberg, B., 2003. Deformed frogs and environmental retinoids. *Pure Appl. Chem.* 75, 2263–2273.
- Goswami, U.C., Barua, A.B., 1981. Distribution of retinol and dehydroretinol in freshwater fish. *Indian J. Biochem. Biophys.* 18, 383–385.
- Hoffmann, C., Eichele, G., 1994. Retinoids in development. In: Sporn, M.B., Roberts, A.B., Goodman, D.S. (Eds.), *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd ed. Raven Press, New York, pp. 387–441.
- Houlahan, J.E., Findlay, C.S., Schmidt, B.R., Meyer, A.H., Kuzmin, S.L., 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404, 752–755.
- Kraft, J.C., Schuh, T., Juchau, M.R., Kimelman, D., 1994. Temporal distribution, localization and metabolism of all-*trans*-retinol, dihydroretinol and all-*trans*-retinal during *Xenopus* development. *Biochem. J.* 30, 111–119.
- Lapierre, L., 1999. Le bassin de la rivière Yamaska: contamination du poisson en 1995, section 4, dans ministère de l'Environnement (éd.), *Le bassin de la rivière Yamaska: état de l'écosystème aquatique*, Québec, Direction des écosystèmes aquatiques, envirodoq n° EN990224, rapport no. EA-14.
- Leclair Jr., R., Leclair, M.H., Dubois, J., Daoust, J.-L., 2000. Age and size of wood frogs, *Rana sylvatica*, from Kuujuaq, Northern Quebec. *Can. Field-Nat.* 114, 381–387.
- Leclair, M.H., Leclair Jr., R., Gallant, J., 2005. Application of skeletochronology to a population of *Pelobates cultripes* (Anura: Pelobatidae) from Portugal. *J. Herpetol.* 39, 199–207.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Marcogliese, D.J., King, K.C., Salo, H., Fournier, M., Brousseau, P., Spear, P., Champoux, L., McLaughlin, J.D., Boily, M., 2009. Combined effects of agricultural activity and parasites on biomarkers in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Aquat. Toxicol.* 91, 126–134.
- Moise, A.R., Kuksa, V., Blaner, W.S., Baehr, W., Palczewski, K., 2005. Metabolism and transactivation activity of 13,14-dihydroretinoic acid. *J. Biol. Chem.* 280, 27815–27825.
- Moise, A.R., Isken, A., Dominguez, M., de Lera, A.R., von Lintig, J., Palczewski, K., 2007. Specificity of zebrafish retinol saturase: formation of all-*trans*-13-14-dihydroretinol and all-*trans*-7,8-dihydroretinol. *Biochemistry* 46, 1811–1820.
- Ndayibagira, A., Spear, P.A., 1999. Esterification and hydrolysis of vitamin A in liver of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the influence of a coplanar polychlorinated biphenyl. *Comp. Biochem. Physiol. C* 122, 317–325.
- Nilsson, C.B., Hanberg, A., Trossvik, C., Håkansson, H., 1996. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin affects retinol esterification in rat hepatic stellate cells and kidney. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2, 17–23.
- Ouellet, M., Bonin, J., Rodrigue, J., DesGranges, J.L., Larr, S., 1997. Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats. *J. Wildl. Dis.* 33, 95–104.
- Pijnappel, W.W.M., Hendriks, H.F.J., Folkers, G.E., van den Brink, C.E., Dekker, E.J., Edelenbosch, C., van der Saag, P.T., Durston, A.J., 1993. Retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is a highly active modulator of positional specification. *Nature* 366, 340–344.
- Porter, W.P., Jaeger, J.W., Carlson, L.H., 1999. Endocrine, immune, and behavioral effects of aldicarb (carbamate), atrazine (triazine) and nitrate (fertilizer) mixtures at groundwater concentrations. *Toxicol. Indus. Health* 15, 130–150.
- Primeau, S., La Violette, N., St-Onge, J., Berryman, D., 1999. Le bassin de la Rivière Yamaska: profil géographique, sources de pollution et interventions d'assainissement. In: Ministère de l'Environnement (éd.), *Le bassin de la Rivière Yamaska: l'état de l'écosystème aquatique*, Québec envirodoq n° EN990224, rapport no. EA-14.
- Rolland, R.M., 2000. A review of chemically-induced alterations in thyroid and Vitamin A status from field studies of wildlife and fish. *J. Wildl. Dis.* 36, 615–635.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M., 2008. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80, 1021–1054.
- Schindler, R., Fliedenbach, T., Rave, G., 2004. Flupenthixol and cefotiam: effects of vitamin A metabolism in rats. *Br. J. Nutr.* 92, 597–605.
- Spear, P.A., Bourbonnais, D.H., 2000. Use of retinoids as biomarkers. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (Eds.), *Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, pp. 205–228.
- Spear, P.A., Moon, T.W., 1986. Thyroid-vitamin A interactions in chicks exposed to 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl: influence of low dietary vitamin A and iodine. *Environ. Res.* 40, 188–198.
- Spear, P.A., Boily, M., Giroux, I., DeBlois, C., Leclair, M.H., Levasseur, M., Leclair, R., 2009. Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in subwatersheds of the River drainage basin, Québec, Canada. *Aquat. Toxicol.* 91, 110–117.
- Sullivan, K.B., Spence, K.M., 2003. Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 627–635.
- Tizmas, G., Bürglin, H., Collins, M.D., Hummler, H., Nau, H., 1994. The high sensitivity of the rabbit to the teratogenic effects of 13-*cis*-retinoic acid (isoretinoin) is a consequence of prolonged exposure of the embryo to 13-*cis*-retinoic acid and 13-*cis*-4-oxo-retinoic acid, and not of isomerization to all-*trans*-retinoic acid. *Arch. Toxicol.* 68, 119–128.

RÉFÉRENCES

- Albert, A., K. Drouillard, G. D. Haffner et B. Dixon. 2007. «Dietary exposure to low pesticide doses causes long-term immunosuppression in the leopard frog (*Rana pipiens*)». *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 26, no 6, p. 1179-1185.
- Ankley, G. T., S. J. Degitz, S. A. Diamond et J. E. Tietge. 2004. «Assessment of Environment stressors potentially responsible for malformations in North American anuran amphibians». *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Vol. 58, no 1, p. 7-16.
- Arcand-Hoy, L. D., et C. D. Metcalfe. 1999. «Biomarkers of exposure of brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) to contaminants in the lower Great Lakes, North America». *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 18, no 4, p. 740-749.
- Armstrong, J. L., C. P. F. Redfern et G. J. Veal. 2005. «13-cis Retinoic acid and isomerisation in paediatric oncology - Is changing shape the key to success?». *Biochem. Pharmacol.* Vol. 69, no 9, p. 1299-1306.
- Barua, A. B., et H. C. Furr. 1998. «Properties of retinoids. Structure, handling, and preparation». *Mol. Biotechnol.* Vol. 10, no 2, p. 167-182.
- Becker, C. G., C. R. Fonseca, C. F. B. Haddad, R. F. Batista et P. I. Prado. 2007. «Habitat split and the global decline of amphibians». *Science*. Vol. 318, no 5857, p. 1775-1777.
- Beebee, T. J. C., et R. A. Griffiths. 2005. «The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology?». *Biol. Conserv.* Vol. 125, no 3, p. 271-285.
- Bérubé, V. E., M. H. Boily, C. DeBlois, N. Dassylva et P. A. Spear. 2005. «Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada». *Aquat. Toxicol.* Vol. 71, no 2, p. 109-120.
- Blumberg, B., D. J. Mangelsdorf, J. A. Dyck, D. A. Bittner, R. M. Evans et E. M. De Robertis. 1992. «Multiple retinoid-responsive receptors in a single cell: Families of retinoid 'X' receptors and retinoic acid receptors in the *Xenopus* egg». *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. Vol. 89, no 6, p. 2321-2325.
- Boily, M. H., V. E. Bérubé, P. A. Spear, C. DeBlois et N. Dassylva. 2005. «Hepatic retinoids of bullfrogs in relation to agricultural pesticides». *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 24, no 5, p. 1099-1106.
- Boily, M. H., M. Bisson et P. A. Spear. 2004. «Rétinoides: Biomarqueurs et base moléculaire d'effets de substances toxiques». Dans *Écotoxicologie Moléculaire, Principes Fondamentaux et Perspectives de Développement*, Édition des presses de l'Université du Québec, p. 197-256.
- Boily, M. H., A. Ndayibagira et P. A. Spear. 2003. «Retinoids, LRAT and REH activities in eggs of Japanese quail following maternal and in ovo exposures to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl». *Ecotoxicol.* Vol. 12, no 1-4, p. 9-21.
- Boily, M., J. Thibodeau et M. Bisson. 2009. «Retinoid metabolism (LRAT, REH) in the liver and plasma retinoids of bullfrog, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural contamination». *Aquat. Toxicol.* Vol. 91, no 2, p. 118-125.

- Boyer, P. M., A. Ndayibagira et P. A. Spear. 2000. «Dose-dependent stimulation of hepatic retinoic acid hydroxylation/oxidation and glucuronidation in brook trout, *Salvelinus fontinalis*, after exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl». *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 19, no 3, p. 700-705.
- Bradford, M. M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding». *Anal. Biochem.* Vol. 72, no 1-2, p. 248-254.
- Brodin, M. A., H. Madhoun, M. Rameswaran et I. Vatnick. 2007. «Atrazine is an immune disruptor in adult northern leopard frogs (*Rana pipiens*)». *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 26, no 1, p. 80-84.
- Casabar, R. C. T., A. D. Wallace, E. Hodgson et R. L. Rose. 2006. «Metabolism of endosulfan- α by human liver microsomes and its utility as a simultaneous in vitro probe for CYP2B6 and CYP3A4». *Drug Metab. Dispos.* Vol. 34, no 10, p. 1779-1785.
- Campo-Paysaa, F., F. Marlétaz, V. Laudet et M. Schubert. 2008. «Retinoic acid signaling in development: Tissue-specific functions and evolutionary origins». *Genesis*. Vol. 46, no 11, p. 640-656.
- Champoux, L., J. Rodrigue, S. Trudeau, M. H. Boily, P. A. Spear et A. Hontela. 2006. «Contamination and biomarkers in the great blue heron, an indicator of the state of the St. Lawrence River». *Ecotoxicol.* Vol. 15, no 1, p. 83-96.
- Daniels, E., et P. Licht. 1980. «Effects of gonadotropin-releasing hormone on the levels of plasma gonadotropins (FSH and LH) in the bullfrog, *Rana catesbeiana*». *Gen. Comp. Endocrinol.* Vol. 42, no 4, p. 455-463.
- Daszak, P., A. A. Cunningham et A. D. Hyatt. 2003. «Infectious disease and amphibian population declines». *Divers. Distrib.* Vol. 9, no 2, p. 141-150.
- Davidson, C., H. B. Shaffer et M. R. Jennings. 2001. «Declines of the California red-legged frog: Climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses». *Ecol. Appl.* Vol. 11, no 2, p. 464-479.
- Desroches, J-F. et D. Rodrigue. 2004. « Guide des amphibiens et reptiles du Québec et des Maritimes ». Éditions Michel Quintin, p. 145-149
- Diez Del Corral, R., I. Olivera-Martinez, A. Goriely, E. Gale, M. Maden et K. Storey. 2003. «Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis formation». *Neuron*. Vol. 40, p. 1-20.
- Doyon, C., R. Fortin et P. A. Spear. 1999. «Retinoic acid hydroxylation and teratogenesis in lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) from the St. Lawrence river and Abitibi region Quebec». *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Vol. 56, no 8, p. 1428-1436.
- Duester, G. 2008. «Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis». *Cell*. Vol. 134, no 6, p. 921-931.
- Dzhagalov, I., P. Chambon et Y. W. He. 2007. «Regulation of CD8+ T lymphocyte effector function and macrophage inflammatory cytokine production by retinoic acid receptor γ ». *J. Immunol.* Vol. 178, no 4, p. 2113-2121.

- Eichele, G. 1989. «Retinoids and vertebrate limb pattern formation». *Trends Genet.* Vol. 5, no 8, p. 246-251.
- Ertesvag, A., N. Engedal, S. Naderi et H. K. Blomhoff. 2002. «Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: Involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion». *J. Immunol.* Vol. 169, no 10, p. 5555-5563.
- Gardiner, D., A. Ndayibagira, F. Grün et B. Blumberg. 2003. «Deformed frogs and *Environ.* retinoids». *Pure Appl. Chem.* Vol. 75, no 11-12, p. 2263-2273.
- Gilbert, N. L., M. J. Cloutier et P. A. Spear. 1995. «Retinoic acid hydroxylation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the effect of a coplanar PCB, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl». *Aquat. Toxicol.* Vol. 32, no 2-3, p. 177-187.
- Giroux, I., 2010. Présence de pesticides dans l'eau au Québec – Bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2005, 2006 et 2007 et dans des réseaux de distribution d'eau potable, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 78 p.
- Giroux, I., C. Robert et N. Dassylva (2006). Présence de pesticides dans l'eau au Québec : bilan dans des cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2002, 2003 et 2004 et dans les réseaux de distribution d'eau potable. Ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement, Direction des politiques de l'eau et Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec ISBN 2-550-46504-0, Envirodoq n° ENV/2006/013, collection n° QE/00173: 57 p.
- Gorse, I., et S. Dion (2009). Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2006. Ministère du Développement durable de l'Environnement et des Parcs. Québec: 83 p.
- Groppelli, S., R. Pennati, F. De Bernardi, E. Menegola, E. Giavini et C. Sotgia. 2005. «Teratogenic effects of two antifungal triazoles, triadimefon and triadimenol, on *Xenopus laevis* development: Craniofacial defects». *Aquat. Toxicol.* Vol. 73, no 4, p. 370-781.
- Gupta, P. K., S. V. Chandra et D. K. Saxena. 1978. «Teratogenic and embryotoxic effects of endosulfan in rats». *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)*. Vol. 42, no 2, p. 150-152.
- Han, I. S., et J. H. Choi. 1996. «Highly specific cytochrome p450-like enzymes for all-trans-retinoic acid in T47D human breast cancer cells». *J. Clin. Endocrinol. Metab.* Vol. 81, no 6, p. 2069-2075.
- Harmon, M. A., M. F. Boehm, R. A. Heyman et D. J. Mangelsdorf. 1995. «Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene». *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Vol. 92, no 13, p. 6157-6160.
- Hayes, T., K. Haston, M. Tsui, A. Hoang, C. Haeffele et A. Vonk. 2003. «Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence». *Environ. Health Perspect.* Vol. 111, no 4, p. 568-575.

- Henry, Y., C. Ducrocq, J. C. Drapier, D. Servent, C. Pellat et A. Guissani. 1991. «Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells». *Eur. Biophys. J.* Vol. 20, no 1, p.1-15.
- Hervé, J. C., D. Crump, S. P. Jones, L. J. Mundy, J. P. Giesy, M. J. Zwiernik, S. J. Bursian, P. D. Jones, S. B. Wiseman, Y. Wan et S. W. Kennedy. 2010. «Cytochrome P4501A Induction by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin and Two Chlorinated Dibenzofurans in Primary Hepatocyte Cultures of Three Avian Species». *Toxicol. Sci.* Vol. 113, no 2, p. 380-391.
- Hoffmann, C., et G. Eichele. 1994. «Retinoids in development». Dans *The Retinoids: Biol., Chem., and Medicine*, M. B. Sporn, A. B. Roberts et D.S. Goodma, New York: Second ed. Raven Press, p. 387-441.
- Hollemann, T., Y. Chen, H. Grunz et T. Pieler. 1998. «Regionalized metabolic activity establishes boundaries of retinoic acid signalling». *EMBO J.* Vol. 17, no 24, p. 7361-7372.
- Hyman, L. E., et W. M. Wormington. 1988. «Translational inactivation of ribosomal protein mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation». *Genes Dev.* Vol. 2, no 5, p. 598-605.
- Idres, N., J. Marill, M. A. Flexor et G. G. Chabot. 2002. «Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by all-trans-retinoic acid metabolites and isomers». *J. Biol. Chem.* Vol. 277, no 35, p. 31491-31498.
- Johnson, C. S., R. M. Zucker, E. S. Hunter Iii et K. K. Sulik. 2007. «Perturbation of retinoic acid (RA)-mediated limb development suggests a role for diminished RA signaling in the teratogenesis of ethanol». *Birth Defects Res. Part A – Clin. Mol. Teratol.* Vol. 79, no 9, p. 631-641.
- Johnson, P. T. J., K. B. Lunde, E. M. Thurman, E. G. Ritchie, S. N. Wray, D. R. Sutherland, J. M. Kapfer, T. J. Frest, J. Bowerman et A. R. Blaustein. 2002. «Parasite (*Ribeiroia ondatrae*) infection linked to amphibian malformations in the western United States». *Ecol. Monographs.* Vol. 72, no 2, p. 151-168.
- Jones-Villeneuve, E. M. V., M. W. McBurney, K. A. Rogers et V. I. Kalnins. 1982. «Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells». *J. Cell Biol.* Vol. 94, no 2, p. 253-262.
- Kawakami, Y., Ñ□ Raya, R. M. Raya, C. Rodriguez-Esteban et J. C. Izpisúa Belmonte. 2005. «Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo». *Nature.* Vol. 435, no 7039, p. 165-171.
- Khatsenko, O., et Y. Kikkawa. 1997. «Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome p450 isoforms in rat liver». *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Vol. 280, no 3, p. 1463-1470.
- Kuzyk, Z. Z. A., N. M. Burgess, J. P. Stow et G. A. Fox. 2003. «Biological effects of marine PCB contamination on black guillemot nestlings at Saglek, Labrador: Liver biomarkers». *Ecotoxicol.* Vol. 12, no 1-4, p. 183-197.

- Lannoo, M. J., D. R. Sutherland, P. Jones, D. Rosenberry, R. W. Klaver, D. M. Hoppe, P. T. J. Johnson, K. B. Lunde, C. Facemire et J. M. Kapfer. 2003. «Multiple causes for the malformed frog phenomenon». Dans *Multiple stressor effects in relation to declining amphibian populations*, G. Linder, E. Little, S. Krest et D. Sparling, Pennsylvania: ASTM Special Technical Publication 1443, p. 233-262.
- Lefebvre, P. 2001. «Molecular basis for designing selective modulators of retinoic acid receptor transcriptional activities». *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* Vol. 1, no 2, p. 153-164.
- Leiva-Presa, A., A. S. Mortensen, A. Arukwe et B. M. Jenssen. 2006. «Altered hepatic retinol and CYP26 levels in adult European common frogs (*Rana temporaria*) exposed to p,p'-DDE». *Marine Environ. Res.* Vol. 62, no SUPPL. 1, p. S10-S15.
- Lemaire, G., G. De Sousa et R. Rahmani. 2004. «A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides». *Biochem. Pharmacol.* Vol. 68, no 12, p. 2347-2358.
- Lemaire, G., P. Balaguer, S. Michel et R. Rahmani. 2005. «Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides». *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 202, no 1, p. 38-49.
- Leo, M. A., S. Iida et C. S. Lieber. 1984. «Retinoic acid metabolism by a system reconstituted with cytochrome P-450». *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 234, no 1, p. 305-312.
- Lever, C. (2003). *Naturalized Reptiles and Amphibians of the World*. New York, Oxford University Press, Oxford, Royaume-Uni, 318 p.
- Li, H. C., et D. Kupfer. 1998. «Mechanism of Induction of Rat Hepatic CYP2B and 3A by the Pesticide Methoxychlor». *J. Biochem. Mol. Toxicol.* Vol. 12, no 6, p. 315-323.
- Loubet, F., et M. Y. Fisman. 1998. «Les cellules souches embryonnaires : Un modèle cellulaire pour l'étude de la différenciation cardiaque normale et pathologique». *Medecine/Sciences.* Vol. 14, no 10, p. 1072-1076.
- Loveridge, A. R., C. A. Bishop, J. E. Elliott et C. J. Kennedy. 2007. «Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides bioaccumulated in green frogs, *Rana clamitans*, from the lower Fraser Valley, British Columbia, Canada». *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 79, no 3, p. 315-318.
- Martin, G. R. 1975. «Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia». *Cell.* Vol. 5, no 3, p. 229-243.
- Mazurais, D., N. Glynatsi, M. J. Darias, S. Christodouloupoulou, C. L. Cahu, J. L. Zambonino-Infante et G. Koumoundouros. 2009. «Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type». *Aquacult.* Vol. 294, no 3-4, p. 262-270.

- McBurney, M. W., E. M. V. Jones-Villeneuve, M. K. S. Edwards et P. J. Anderson. 1982. «Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line». *Nature*. Vol. 299, no 5879, p. 165-167.
- McCallum, M. L. 2007. «Amphibian decline or extinction? Current declines dwarf background extinction rate». *J. Herpetol.* Vol. 41, no 3, p. 483-491.
- McCreery, B. R., et P. Licht. 1983. «Induced ovulation and changes in pituitary responsiveness to continuous infusion of gonadotropin-releasing hormone during the ovarian cycle in the bullfrog, *Rana catesbeiana*». *Biol. Reprod.* Vol. 29, no 4, p. 863-871.
- McKenzie, R. M., D. M. Hellwege, M. L. McGregor et E. C. Nelson. 1979. «Oxidation and isomerization of retinoic acid by iodine and light: A novel preparation of all-trans- and 13-cis-4-oxoretinoic acid». *Lipids*. Vol. 14, no 8, p. 714-717.
- McSorley, L. C., et A. K. Daly. 2000. «Identification of human cytochrome P450 isoforms that contribute to all-trans-retinoic acid 4-hydroxylation». *Biochem. Pharmacol.* Vol. 60, no 4, p. 517-526.
- McMenamin, S. K., E. A. Hadly et C. K. Wright. 2008. «Climatic change and wetland desiccation cause amphibian decline in Yellowstone National Park». *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol. 105, no 44, p. 16988-16993.
- Menegola, E., M. L. Broccia, F. Di Renzo et E. Giavini. 2006. «Postulated pathogenic pathway in triazole fungicide induced dysmorphogenic effects». *Reprod. Toxicol.* Vol. 22, no 2, p. 186-195.
- Meteyer, C. U., I. Kati Loeffler, J. F. Fallon, K. A. Converse, E. Green, J. C. Helgen, S. Kersten, R. Levey, L. Eaton-Poole et J. G. Burkhart. 2000. «Hind limb malformations in free-living northern leopard frogs (*Rana pipiens*) from Maine, Minnesota, and Vermont suggest multiple etiologies». *Teratol.* Vol. 62, no 3, p. 151-171.
- Moreno, T. A., R. Jappelli, J. C. I. Belmonte et C. Kintner. 2008. «Retinoic acid regulation of the Mesp-Ripply feedback loop during vertebrate segmental patterning». *Develop. Biol.* Vol. 315, no 2, p. 317-330.
- Moreno, T. A., et C. Kintner. 2004. «Regulation of segmental patterning by retinoic acid signaling during *Xenopus* somitogenesis». *Develop. Cell.* Vol. 6, no 2, p. 205-218.
- Morris-Kay, G. M., et N. Sokolova. 1996. «Embryonic development and pattern formation». *FASEB J.* Vol. 10, no 9, p. 961-968.
- Murk, A. J., P. E. G. Leonards, B. Van Hattum, R. Luit, M. E. J. Van Der Weiden et M. Smit. 1998. «Application of biomarkers for exposure and effect of polyhalogenated aromatic hydrocarbons in naturally exposed European otters (*Lutra lutra*)». *Environ. Toxicol. Pharmacol.* Vol. 6, no 2, p. 91-102.
- Napoli, J. L. 1993. «Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: Roles of CRBP and CRABP in retinoic acid: Roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis». *J. Nutr.* Vol. 123, no 2, p. 362-366.

- Napoli, J. L. 1996. «Retinoic acid biosynthesis and metabolism». *FASEB J.* Vol. 10, no 9, p. 993-1001.
- Napoli, J. L. 1999. «Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism». *Biochimica et Biophysica Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* Vol. 1440, no 2-3, p. 139-162.
- Nezzar, H., F. Chiambaretta, G. Marceau, L. Blanchon, B. Faye, P. Dechelotte, D. Rigal et V. Sapin. 2007. «Molecular and metabolic retinoid pathways in the human ocular surface». *Mol. Vision.* Vol. 13, p. 1641-1650.
- Nyström, P., J. Hansson, J. Mansson, M. Sundstedt, C. Reslow et A. Broström. 2007. «A documented amphibian decline over 40 years: Possible causes and implications for species recovery». *Biol. Conserv.* Vol. 138, no 3-4, p. 399-411.
- Ottolenghi, A. D., J. K. Haseman et F. Suggs. 1974. «Teratogenic effects of aldrin, dieldrin, and endrin in hamsters and mice». *Teratol.* Vol. 9, no 1, p. 11-16.
- Ottonello, S., G. Scita, G. Mantovani, D. Cavazzini et G. L. Rossi. 1993. «Retinol bound to cellular retinol-binding protein is a substrate for cytosolic retinoic acid synthesis». *J. Biol. Chem.* Vol. 268, no 36, p. 27133-27142.
- Ouellet, M., J. Bonin, J. Rodrigue, J. L. DesGranges et S. Lair. 1997. «Hindlimb deformities (ectromelia, ectrodactyly) in free-living anurans from agricultural habitats». *J. Wildl. Dis.* Vol. 33, no 1, p. 95-104.
- Papis, E., G. Bernardini, R. Gornati et M. Prati. 2006. «Triadimefon causes branchial arch malformations in *Xenopus laevis* embryos». *Environ. Sci. Poll. Res.* Vol. 13, no 4, p. 251-255.
- Paquin, J., B. A. Danalache, M. Jankowski, S. M. McCann et J. Gutkowska. 2002. «Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 99, no 14, p. 9550-9555.
- Pignatello, M. A., F. C. Kauffman et A. A. Levin. 1997. «Multiple factors contribute to the toxicity of the aromatic retinoid, TTNPB (Ro 13-7410): Binding affinities and disposition». *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 142, no 2, p. 319-327.
- Pijnappel, W. W. M., H. F. J. Hendriks, G. E. Folkers, C. E. Van Den Brink, E. J. Dekker, C. Edelenbosch, P. T. Van Der Saag et A. J. Durston. 1993. «The retinoid ligand 4-oxo-retinoic acid is highly active modulator of positional specification». *Nature.* Vol. 366, no 6453, p. 340-344.
- Pounds, J. A., M. R. Bustamante, L. A. Coloma, J. A. Consuegra, M. P. L. Fogden, P. N. Foster, E. La Marca, K. L. Masters, A. Merino-Viteri, R. Puschendorf, S. R. Ron, G. A. Sánchez-Azofeifa, C. J. Still et B. E. Young. 2007. «Global warming and amphibian losses; The proximate cause of frog declines? (Reply)». *Nature.* Vol. 447, no 7144.
- Raffel, T. R., T. Bommarito, D. S. Barry, S. M. Witiak et L. A. Shackelton. 2008. «Widespread infection of the Eastern red-spotted newt (*Notophthalmus viridescens*) by a new species of *Amphibiocystidium*, a genus of fungus-like mesomycetozoan parasites not previously reported in North America». *Parasitol.* Vol. 135, no 2, p. 203-215.

- Ramp, U., C. D. Gerharz, E. Eifler, H. K. Biesalski et H. E. Gabbert. 1994. «Effects of retinoic acid metabolites on proliferation and differentiation of the clonal rhabdomyosarcoma cell line BA-HAN-1C». *Biol. Cell*. Vol. 81, no 1, p. 31-37.
- Ray, W. J., G. Bain, M. Yao et D. I. Gottlieb. 1997. «CYP26, a novel mammalian cytochrome P450, is induced by retinoic acid and defines a new family». *J. Biol. Chem.* Vol. 272, no 30, p. 18702-18708.
- Relyea, R. A. 2005. «The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities». *Ecol. Appl.* Vol. 15, no 2, p. 618-627.
- Relyea, R. A. 2009. «A cocktail of contaminants: How mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities». *Oecologia*. Vol. 159, no 2, p. 363-376.
- Relyea, R. A., et N. Diecks. 2008. «An unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations». *Ecol. Appl.* Vol. 18, no 7, p. 1728-1742.
- Rushton, W. A. H., et G. H. Henry. 1968. «Bleaching and regeneration of cone pigments in man». *Vision Res.* Vol. 8, no 6, p. 617-631.
- Satre, M. A., et D. M. Kochhar. 1989. «Elevations in the endogenous levels of the putative morphogen retinoic acid in embryonic mouse limb-buds associated with limb dysmorphogenesis». *Develop. Biol.* Vol. 133, no 2, p. 529-536.
- Schoff, P. K., C. M. Johnson, A. M. Schotthoefer, J. E. Murphy, C. Lieske, R. A. Cole, L. B. Johnson et V. R. Beasley. 2003. «Prevalence of skeletal and eye malformations in frogs from North-Central United States: Estimations based on collections from randomly selected sites». *J. Wildl. Dis.* Vol. 39, no 3, p. 510-521.
- Schultz, R. M., et P. M. Wassarman. 1977. «Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse». *J. Cell Sci.* Vol. 24, p. 167-194.
- Sessler, R. J., et N. Noy. 2005. «A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II». *Mol. Cell.* Vol. 18, no 3, p. 343-353.
- Solari, M, J. Paquin, P. Ducharme et M. Boily. 2010. «P19 neuronal differentiation and retinoic acid metabolism as criteria to investigate atrazine, nitrite and nitrate». *Toxicol. Sci.* Vol. 113, no 1, p. 116-126.
- Sonneveld, E., C. E. Van Den Brink, L. G. J. Tertoolen, B. Van Der Burg et P. T. Van Der Saag. 1999. «Retinoic acid hydroxylase (CYP26) is a key enzyme in neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells». *Develop. Biol.* Vol. 213, no 2, p. 390-404.
- Sonneveld, E., C. E. Van Den Brink, B. J. M. Van Der Leede, R. K. A. M. Schulkes, M. Petkovich, B. Van Der Burg et P. T. Van Der Saag. 1998. «Human retinoic acid (RA) 4-hydroxylase (CYP26) is highly specific for all-trans-RA and can be induced through RA receptors in human breast and colon carcinoma cells». *Cell Growth Differ.* Vol. 9, no 8, p. 629-637.

- Sparling, D. W., G. M. Fellers et L. L. McConnell. 2001. «Pesticides and amphibian population declines in California, USA». *Environ. Toxicol. Chem.* Vol. 20, no 7, p. 1591-1595.
- Spear, P. A., M. Boily, I. Giroux, C. DeBlois, M. H. Leclair, M. Levasseur et R. Leclair. 2009. «Study design, water quality, morphometrics and age of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in sub-watersheds of the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada». *Aquat. Toxicol.* Vol. 91, no 2, p. 110-117.
- Stuart, S. N., J. S. Chanson, N. A. Cox, B. E. Young, A. S. L. Rodrigues, D. L. Fischman et R. W. Waller. 2004. «Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide». *Science*. Vol. 306, no 5702, p. 1783-1786.
- Sulik, K. K., et D. B. Dehart. 1988. «Retinoic-acid-induced limb malformations resulting from apical ectodermal ridge cell death». *Teratol.* Vol. 37, no 6, p. 527-537.
- Tannahill, D., et D. A. Melton. 1989. «Localized synthesis of the Vg1 protein during early *Xenopus* development». *Develop.* Vol. 106, no 4, p. 775-785.
- Tzimas, G., et H. Nau. 2001. «The role of metabolism and toxicokinetics in retinoid teratogenesis». *Curr. Pharm. Des.* Vol. 7, no 9, p. 803-831.
- Vandenlangenberg, S. M., J. T. Canfield et J. A. Magner. 2003. «A regional survey of malformed frogs in Minnesota (USA) (Minnesota malformed frogs)». *Environ. Monit. Assess.* Vol. 82, no 1, p. 45-61.
- Vermot, J., J. G. Llamas, V. Fraulob, K. Niederreither, P. Chambon et P. Dollé. 2005. «Retinoic acid controls the bilateral symmetry of somite formation in the mouse embryo». *Science*. Vol. 308, no 5721, p. 563-566.
- Vermot, J., et O. Pourquié. 2005. «Retinoic acid coordinates somitogenesis and left-right patterning in vertebrate embryos». *Nature*. Vol. 435, no 7039, p. 215-220.
- White, J. A., Y. D. Guo, K. Baetz, B. Beckett-Jones, J. Bonasoro, K. E. Hsu, F. Jeffrey Dilworth, G. Jones et M. Petkovich. 1996. «Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4- hydroxylase». *J. Biol. Chem.* Vol. 271, no 47, p. 29922-29927.
- White, R. J., Q. Nie, A. D. Lander et T. F. Schilling. 2007. «Complex regulation of cyp26a1 creates a robust retinoic acid gradient in the zebrafish embryo». *PLoS Biol.* Vol. 5, no 11, p. 2522-2533.
- Williams, J. B., et J. L. Napoli. 1985. «Metabolism of retinoic acid and retinol during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells». *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Vol. 82, no 14, p. 4658-4662.
- Wolf, G. 2001. «Retinoic acid homeostasis: Retinoic acid regulates liver retinol esterification as well as its own catabolic oxidation in liver». *Nutrit. Rev.* Vol. 59, no 12, p. 391-394.
- Yashiro, K., X. Zhao, M. Uehara, K. Yamashita, M. Nishijima, J. Nishino, Y. Saijoh, Y. Sakai et H. Hamada. 2004. «Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb». *Develop. Cell.* Vol. 6, no 3, p. 411-422.

- Zhao, X., I. O. Sirbu, F. A. Mic, N. Molotkova, A. Molotkov, S. Kumar et G. Duester. 2009. «Retinoic Acid Promotes Limb Induction through Effects on Body Axis Extension but Is Unnecessary for Limb Patterning». *Curr. Biol.* Vol. 19, no 12, p. 1050-1057.
- Zile, M. H. 2001. «Function of vitamin A in vertebrate embryonic development». *J. Nutrit.* Vol. 131, no 3, p. 705-708